

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE ORQUÍDEAS DEL
GÉNERO *DRACULA*, MEDIANTE EL SISTEMA BARCODE**

**AUTOR:
MARIO LEÓN IZA ARTEAGA**

**TUTOR:
MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS**

Quito, Enero del 2018

Cesión de derechos de autor

Yo, Mario León Iza Arteaga, con documento de identificación N° 0502812704, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO *DRACULA*, MEDIANTE EL SISTEMA BARCODE”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Mario León Iza Arteaga
0502812704

Quito, Enero del 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO *DRACULA*, MEDIANTE EL SISTEMA BARCODE” realizado por Mario León Iza Arteaga, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Enero del 2018



Marco Fernando Cerna Cevallos

CI.0501872071

Dedicatoria

“Los sueños se cumplen, no gracias a la suerte, sino más bien al esfuerzo y dedicación”.

Colin Powell

A Dios, por brindarme día a día la fortaleza, salud y sabiduría para saber sobrellevar la vida universitaria lejos de mi familia. A mis padres Mario Iza y Evita Arteaga quienes me motivaban a esforzarme cada día más y nunca desmayar hasta alcanzar mi meta. Especialmente a mi madre que día a día luchó para solventar los gastos económicos que se requerían.

Hermanos y hermana por ser parte de este logro alcanzado.

Dedico también a Arianna por ser un pilar fundamental en este logro y por estar siempre a mi lado desde el inicio hasta el final de esta meta alcanzada.

Atte. Mario

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana, por ser el lugar que me abrió las puertas para realizar mis estudios, donde tuve la oportunidad de conocer excelentes docentes de alta calidad profesional y de llevarme gratos recuerdos y enseñanzas.

Agradezco especialmente a mi tutor, Dr. Marco Cerna Ph.D., quien supo brindarme el apoyo y la confianza para realizar este trabajo experimental.

Agradezco infinitamente al Lic. Luis Baquero por su asesoría en este trabajo, de igual manera agradezco a todo el personal de los laboratorios de Biotecnología, al Orquideario de Sarina, al grupo de Investigación NUNKUI WAKAN por sus cooperaciones en la realización de este trabajo y a todas las personas que me apoyaron moralmente y se hicieron partícipes en este trayecto de mi vida.

Índice

| | |
|--|----|
| Introducción | 1 |
| CAPÍTULO I..... | 3 |
| 1. Marco conceptual | 3 |
| 1.1 Familia Orchidaceae | 3 |
| 1.2 Taxonomía: | 5 |
| 1.3 Importancia de la Familia: | 5 |
| 1.4 Género <i>Dracula</i> | 6 |
| 1.4.1 Descripción botánica y morfológica | 6 |
| 1.4.2 Cápsulas y semillas | 8 |
| 1.4.3 Micorrizas | 9 |
| 1.4.4 Polinización..... | 10 |
| 1.5 Diversidad y distribución del género | 11 |
| 1.6 Marcadores moleculares | 16 |
| 1.7 Marcadores moleculares en orquídeas..... | 18 |
| 1.7.1 Región <i>MatK</i> | 18 |
| 1.7.2 Región <i>rpoC1</i> | 19 |
| 1.7.3 Región <i>rpoB</i> | 20 |
| 1.8 ADN Barcode | 20 |
| CAPÍTULO II | 23 |
| 2. Materiales y métodos:..... | 23 |
| 2.1 Colección muestras | 23 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 2.2 Estudio molecular | 23 |
| 2.2.1 Extracción de ADN | 24 |
| 2.2.2 Cuantificación de ADN | 25 |
| 2.2.3 Amplificación de ADN | 26 |
| 2.2.4 Secuenciación..... | 28 |
| 2.2.5 Filogenia..... | 28 |
| 2.3 Georreferenciación: | 29 |
| CAPÍTULO III..... | 30 |
| 3. Resultados y Discusión..... | 30 |
| 3.1 Colección de muestras | 30 |
| 3.2 Estudio Molecular..... | 34 |
| 3.2.1 Extracción de ADN:..... | 34 |
| 3.2.2 Amplificación..... | 35 |
| 3.2.3 Secuenciación..... | 37 |
| 3.2.4 Análisis de secuencias..... | 37 |
| 3.2.5 Filogenia..... | 38 |
| 3.3 Georreferenciación..... | 47 |
| 4. Conclusiones | 50 |
| 5. Recomendaciones..... | 51 |
| 6. Bibliografía | 52 |
| 7. Anexos | 61 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Especies del género <i>Dracula</i> descritas en Ecuador..... | 12 |
| Tabla 2 Clasificación subgenérica actual del género <i>Dracula</i> | 16 |
| Tabla 3 Esquema sintético de trabajos comparativos de varios locus propuestos como códigos de barras genéticos en plantas..... | 22 |
| Tabla 4 Preparación de la mezcla PCR con Green PCR Master mix (2x)..... | 26 |
| Tabla 5 Preparación de la mezcla PCR con Phire Plant Direct PCR Master Mix..... | 26 |
| Tabla 6 Primers utilizados para la amplificación de regiones cloroplásticas de ADN..... | 27 |
| Tabla 7 Listado de todas las especies <i>Dracula</i> (Orchidaceae) colectadas para este estudio..... | 30 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Flor de orquídea (<i>Odontoglossum crispum</i>). | 4 |
| Figura 2. Subfamilias de la familia (Orchidaceae)..... | 5 |
| Figura 3. Descripción morfológica de <i>Dracula gigas</i> | 7 |
| Figura 4. Estadios del desarrollo de protocormos de semillas de orquídeas..... | 8 |
| Figura 5. Regiones de ADN designadas para el sistema BARCODE en plantas. | 17 |
| Figura 6. Estructura de la región <i>matK</i> (maturase K) de angiospermas..... | 19 |
| Figura 7. Bandas de DNA de diferente tamaño (5000 – 100 pb) que migran de forma distinta en electroforesis en gel de agarosa..... | 25 |
| Figura 8. Productos extraídos de ADN usando el método Doyle y Doyle, (1987) modificado por Massensini Jr., (2013). Gel agarosa 1%..... | 35 |
| Figura 9. Productos de amplificación con el marcador <i>matK</i> | 36 |
| Figura 10. Productos de amplificación con el marcador <i>rpoC1</i> . Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra..... | 36 |
| Figura 11. Productos de amplificación con el marcador <i>rpoB</i> . Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra..... | 37 |
| Figura 12. Árbol filogenético Neighbor-Joining de la región <i>matK</i> mediante el método Jukes-Cantor y bootstrap de 1000 réplicas. | 39 |
| Figura 13. Árbol filogenético Neighbor-Joining de la región <i>rpoC1</i> mediante el método Jukes-Cantor y bootstrap de 1000 réplicas. | 40 |
| Figura 14. Árbol filogenético Neighbor-Joining de la región <i>rpoB</i> mediante el método Jukes-Cantor y bootstrap de 1000 réplicas. | 41 |
| Figura 15. Árbol filogenético Neighbor-Joining concatenadas las regiones <i>matK</i> y <i>rpoC1</i> mediante el método Jukes-Cantor y bootstrap de 1000 réplicas. | 42 |
| Figura 16. Zonas de diversificación del genero <i>Dracula</i> | 48 |

Índice de anexos

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Condiciones de temperatura en el termociclador. | 61 |
| Anexo 2. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN | 62 |
| Anexo 3. Datos de georreferenciación del género <i>Dracula</i> | 66 |

|

Resumen

La familia (Orchidaceae) se destaca como una de las más importantes por contener un gran número de especies de alto valor económico; en la actualidad dentro del género *Dracula* se reconocen alrededor de 130 especies en el mundo y 56 especies se encuentran descritas en el Ecuador, se recolectaron un total de 144 individuos de *Dracula* en diferentes orquidearios dentro de las provincias de Pichincha y Carchi, se realizó una identificación molecular mediante el sistema BARCODE para determinar la posible existencia de nuevas especies y la resolución de problemas subgenéricos de este género. La ausencia de floración para su identificación morfológica hace recurrir a técnicas moleculares que permitan su eficaz identificación. Se procedió a la extracción de ADN de las especies colectadas, posteriormente se amplificaron las regiones cloroplásticas *matK*, *rpoC1* y *rpoB* mediante la técnica PCR convencional para su secuenciación y finalmente se estableció la filogenia del género mediante el software MEGA 6. Los resultados obtenidos mostraron que la región *matK* presenta un buen potencial de discriminación hasta el nivel de subsección, los marcadores *rpoC1* y *rpoB* no mostraron ser útiles para este estudio. Por lo cual se sugiere investigar con nuevas regiones de ADN cloroplástico y nuclear que permitan resolver las inconsistencias subgenéricas del género *Dracula*.

Palabras clave: Orchidaceae, *Dracula*, *matK*, *rpoC1*, *rpoB*, AND Barcoding

Abstract

The family (Orchidaceae) stands out as one of the most important because it contains a large number of species of high economic value; At present, within the *Dracula* genus around 130 species are recognized in the world and 56 species are described in Ecuador, a total of 144 individuals of *Dracula* were collected in different orchids within the provinces of Pichincha and Carchi, molecular identification through the BARCODE system to determine the possible existence of new species and the resolution of subgeneric problems of this genus. The absence of flowering for its morphological identification makes use of molecular techniques that allow its effective identification. We proceeded to the extraction of DNA from the species collected, then the chloroplastic regions *matK*, *rpoC1* and *rpoB* were amplified using the conventional PCR technique for sequencing and finally the phylogeny of the genus was established by the MEGA 6 software. The results obtained showed that the *matK* region presents a good potential for discrimination up to the subsection level, the *rpoC1* and *rpoB* markers did not prove useful for this study. Therefore it is suggested to investigate with new regions of chloroplastic and nuclear DNA that allow to solve the subgeneric inconsistencies of the genus *Dracula*.

Key words: Orchidaceae, *Dracula*, *matK*, *rpoC1*, *rpoB*, AND Barcoding.

Introducción

Para Aguilar (2003), la familia Orchidaceae es una de las más extensas en géneros y especies en el mundo. Su gran complejidad para definir límites entre los géneros y especies origina debates entre los científicos que estudian esta familia. En la actualidad se reconocen alrededor de 130 especies dentro del género *Dracula*, distribuidas desde el sureste de México hasta Perú, pero con una mayor concentración en los bosques andinos de Colombia y Ecuador, donde se conocen 72 especies en Colombia y 56 especies en Ecuador (Luer, 1993; Calderón y Farfán, 2003; Pupulin, Merino y Medina, 2009; Baquero Rivadeneira y Moncayo Cárdenas, 2017).

La identificación correcta de especies pertenecientes a la familia Orchidaceae no ha sido del todo posible con base únicamente en la morfología (Aguilar, 2003). Complementario a los estudios de tipo morfológico, se presentan los estudios de tipo molecular, los cuales se basan en técnicas de biología molecular y particularmente en el uso de marcadores moleculares; con lo cual se ha permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos permitiendo identificarlos en estado vegetativo según Cräutlein, Korpelainen, Pietiläinen, y Rikkinen (2011).

En el Ecuador son escasos los estudios moleculares específicamente del género *Dracula*, siendo los de más prevalencia los estudios morfológicos y según Molineros (2012), la ausencia de floración durante largos meses, hace recurrir a técnicas moleculares que permitan su eficaz identificación. Durante los últimos años en los países donde crecen especies del género *Dracula* ha existido una amenaza hacia estas especies vegetales, generada por el crecimiento de la frontera agrícola, la extracción maderera, el cambio en el uso del suelo, entre otros (Carrión, 2009).

Existen estudios a nivel general de orquídeas sobre diversidad genética como se cita a continuación: En el trabajo de Carrión (2009) acerca de “Identificación de Orquídeas Epífitas del Ecuador mediante DNA Barcoding.” Donde veintidós especies de tres subtribus morfológicamente ya identificadas, se analizaron filogenéticamente utilizando el DNA de tres regiones, dos de plastidos *matK*, *trnL-F* y una región de DNA nuclear *ITS*; la autora precisa que, la región apropiada para barcoding es *matK* por presentar mayor variabilidad.

Un segundo trabajo presentado por Cuéllar (2011) donde se realizó “Código de barras genéticos de algunas orquídeas veracruzanas bajo riesgo de extinción”. Obtuvieron secuencias de las regiones de ADN de cloroplasto *matK* y *rbcL* como los códigos de barras estándares en veinte especies de orquídeas protegidas de Veracruz en México. Como resultado obtuvieron que *matK* fue la mejor región como código de barras genético logrando identificar 100% de las muestras; por el contrario *rbcL* pudo identificar al 80% de las muestras.

El objetivo general del presente estudio es identificar molecularmente especies de orquídeas del género *Dracula* mediante el sistema BARCODE para determinar la posible existencia de nuevas especies y resolver problemas de este grupo.

Con este fin se colectaron muestras de tejido de especies del género *Dracula* procedentes de orquidearios, viveros y jardines botánicos del Ecuador para la extracción de su ADN; posteriormente se amplificaron las regiones cloroplásticas *matK*, *rpoC1* y *rpoB* mediante la técnica PCR convencional con el propósito de evaluar el potencial de discriminación a nivel de especie, además con la herramienta MEGA 6 se analizó la filogenia del género *Dracula*.

Capítulo I

1. Marco conceptual

1.1 Familia Orchidaceae

El particular nombre de esta familia proviene de la palabra griega *orkhis*, que significa testículos y fue atribuida por Teofrasto de Ereso (371 – 286 a.C.) para nombrar en su obra “*De causis plantarum*” (Molineros, 2012). La distribución es sumamente amplia, con mayor diversidad en los trópicos y en las montañas tropicales (Herber, 2014).

La Familia Orchidaceae es catalogada una de las más extensas angiospermas; según The Plant List (2017), en su portal web a nivel mundial existen registradas dentro de la familia Orchidaceae 27801 especies y 899 géneros.

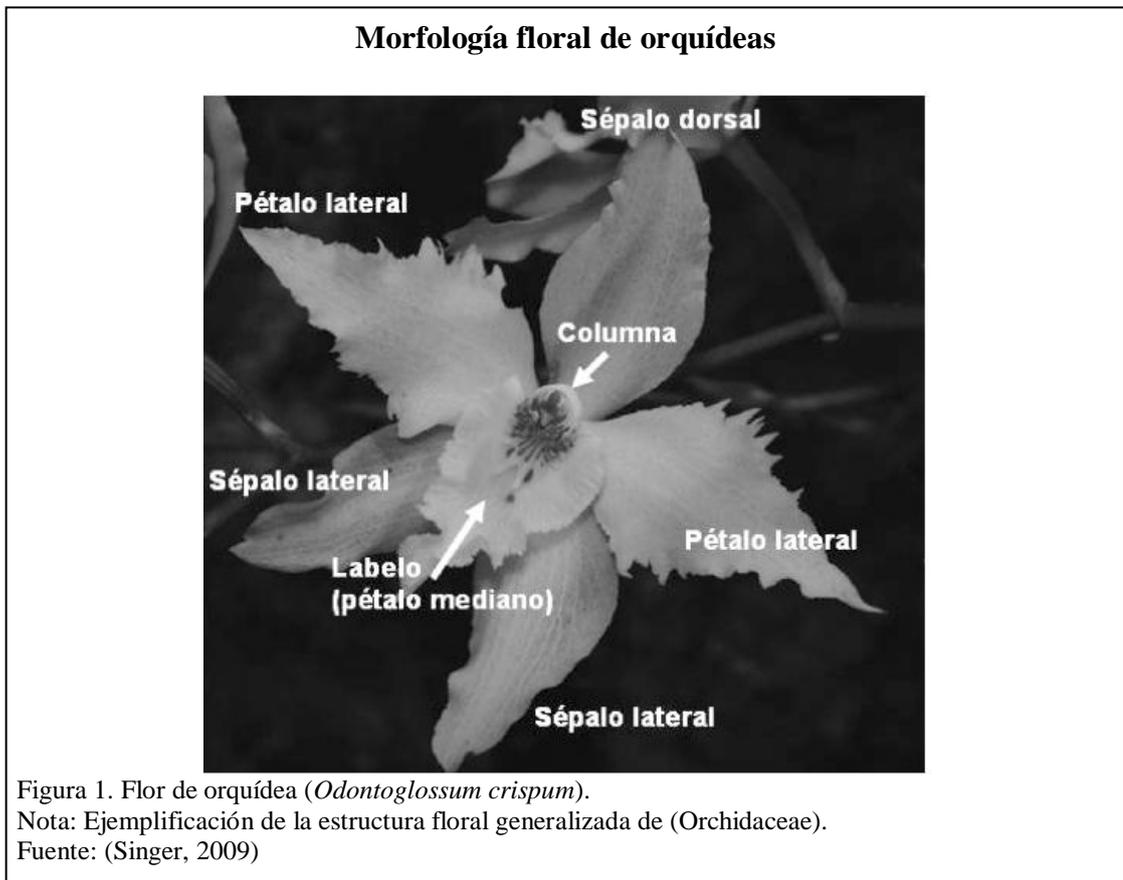
En el artículo “*Dracula gigas* es la orquídea emblemática de Carchi”, el Ministerio de Turismo del Ecuador (2014) menciona:

El país posee cuatro de las cinco subfamilias de orquídeas existentes a escala mundial, totalizando 4032 de las especies que hasta el momento han sido clasificadas y publicadas, de las cuales 1714 son endémicas. Además, hay 400 especies que aún se encuentran en proceso de estudio y descripción. (p.4)

Del total de estas especies aproximadamente el 40% son endémicas es decir que habitan únicamente en este lugar del planeta (Aguilar, 2003).

Zambrano y Solano-Gómez (2011) mencionan que Ecuador se encuentra considerado dentro de los 17 países con mayor diversidad en el mundo, la familia Orchidaceae se destaca como una de las más importantes. Por estas razones, con el apoyo de la comunidad científica internacional, en noviembre de 2013, Ecuador fue declarado

como "Tierra de las Orquídeas" Seguido de Colombia y Perú, por contener la mayor cantidad de taxones registrados (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2014).

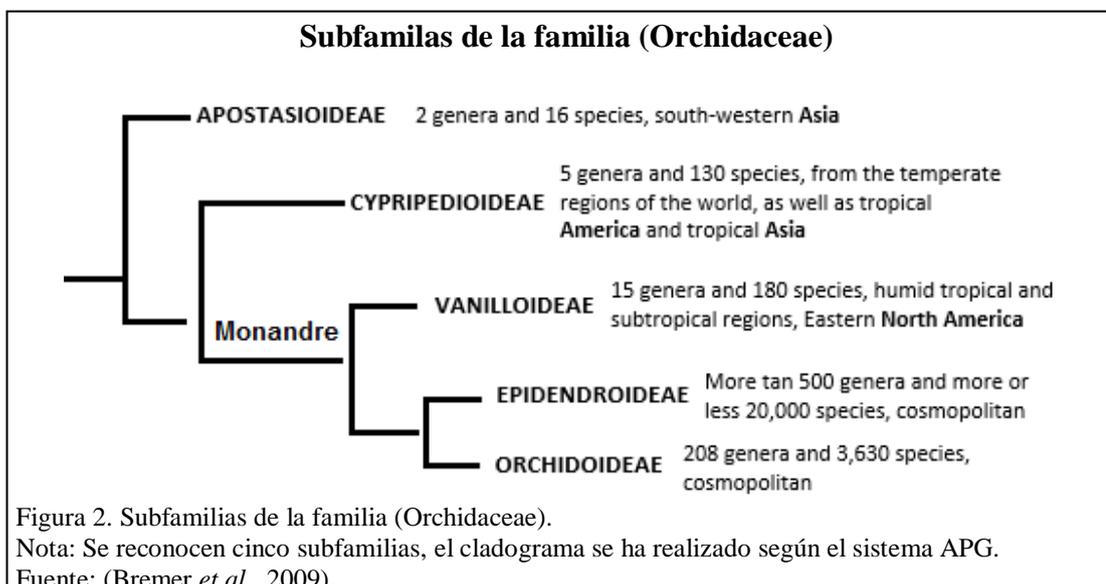


Givnish *et al.* (2016), mencionan que las orquídeas provienen de Australia hace 112 millones de años, posteriormente se extendieron a los Neotrópicos a través de la Antártida por 90 millones de años; el surgimiento de las orquídeas se da cuando los tres continentes estaban en estrecho contacto, la subfamilia Apostasioideae aparece cuando se separa del antepasado de todas las otras orquídeas; así mismo luego las otras subfamilias Cyripedioideae, Orchidoideae, Epidendroideae y Vanilloideae parecen haberse originado en los Neotrópicos 84-64 millones de años a lo largo de la historia de las orquídeas; el sudeste asiático fue la fuente más importante y maximizó la diversificación neta acelerada.

1.2 Taxonomía:

La taxonomía de la familia Orchidaceae está en constante investigación, al pasar el tiempo se presentan nuevos estudios que permiten identificar elementos más clasicatorios (Cetzal-Ix, Carnevali, y Romero-González, 2016). (Orchidaceae) se encuentra actualmente en el orden Asparagales por el sistema APG III de 2009 y cuenta con cinco subfamilias que se indican a continuación, ver Fig. 2 (Bremer *et al.*, 2009).

Reino: Plantae
Fhyllum: Angiospermas
Clase: Lilopsida
Orden: Asparagales u Orchidales
Familia: Orchidaceae (Herber, 2014)



1.3 Importancia de la Familia:

La belleza de sus flores, su interacción ecológica con las micorrizas y sus agentes polinizadores les brinda una gran atracción en el mundo científico, turístico, comercial y de conservación a las especies de la familia Orchidaceae, lo que conlleva a esta familia ser de gran interés de investigación para este grupo de plantas (Klaus, 2015).

Al ser epífitas en su mayoría, en los bosques están estrechamente relacionadas con el funcionamiento del ecosistema, siendo proveedoras de néctar, frutos o semillas, para insectos y así como también hábitat para nidos de aves (Carrión, 2009).

1.4 Género *Dracula*

El extraño nombre *Dracula* se deriva del latín que significa “pequeño dragón”, el cual alude al raro aspecto de los dos espolones de sus sépalos (Sinchire, 2010). El alusivo nombre propuesto por Luer contribuyó a la popularidad de las colecciones contemporáneas del género que hacían referencia al siniestro Conde de Transilvania pero esto no tenía nada que ver con el nombre propuesto al género (Luer, 1993; Pupulin, Merino, y Medina, 2009). En la antigüedad las especies de *Dracula* que actualmente se conocen fueron incluidas en el género *Masdevallia*, pero se convirtió en un género separado a éste en 1978 (Calderón y Farfán, 2003). *Dracula* Luer es un género de orquídeas principalmente epífitas, aunque a veces llegan a ser terrestres, que habitan en los bosques húmedos y de neblina del neotrópico y que pertenece a la subtribu Pleurothallidinae (Zambrano y Solano-Gómez, 2011).

1.4.1 Descripción botánica y morfológica

Las especies del género *Dracula* presentan hojas levemente coriáceas y carinadas, sépalos internamente pubescentes, pétalos ensanchados y bilaminados o bivalvados apicalmente, labelo generalmente sacciforme con venas radiales y divididas en un hipoquilo y epiquilo (Luer, 1993; Pupulin *et al.*, 2009). Ver figura 3.

Dracula gigas

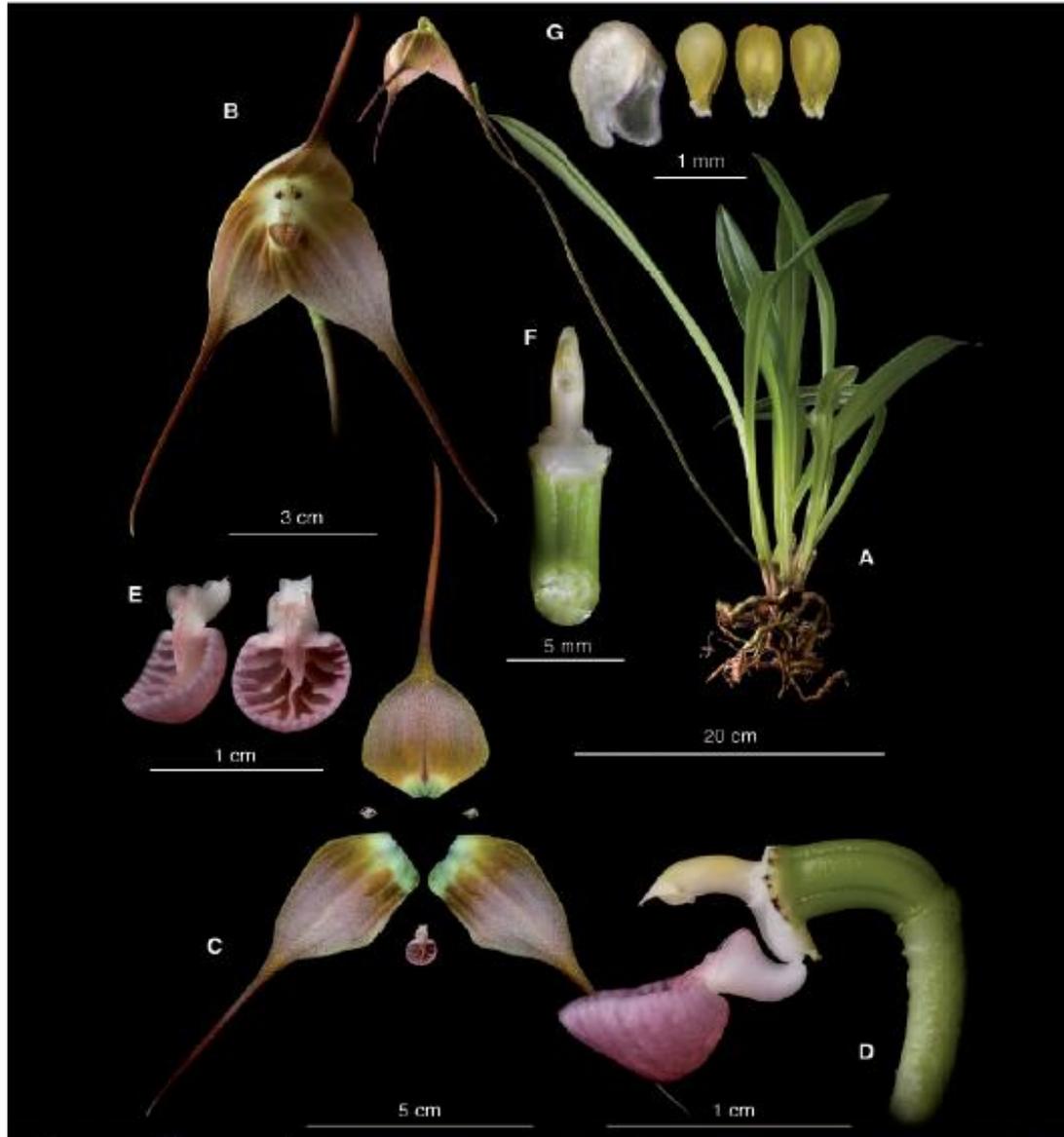


Figura 3. Descripción morfológica de *Dracula gigas*.

A= Hábito; B= Flor; C= Periantio seccionado; D= Pedicelo, ovario, columna y labelo, vista lateral; E= Labelo, vistas de tres cuartos y ventral; F= Columna y ovario, vista ventral; G= Capucha de la antera y polinario (tres vistas).

Fuente: (Pupulin *et al.*, 2009).

Los tallos de la flor crecen derechos, pueden también crecer estos tallos entre las raíces, mientras otras aparecen colgando bajo la planta; la terminación de las flores es básicamente triangular; hay más de un brote de la flor en cada racimo; estas flores tienen un aspecto raro, debido a las colas largas en cada sépalo; los pétalos son pequeños y un poco espesados; el labio es pequeño y discreto; la parte basal carnosa

del labio llamada hipoquilo se encuentra hendido y la parte terminal llamada el epiquilo es redondeada y cóncava (Policha *et al.*, 2016).

Raramente son terrestres y se encuentran en taludes húmedos cubiertas de grandes cantidades de hojarasca y de humos en forma de capas, pero en su gran mayoría las especies de *Dracula* son epífitas (Pupulin *et al.*, 2009).

1.4.2 Cápsulas y semillas

Cada cápsula puede contener entre 1300 a 4000000 semillas; las semillas de orquídeas son muy pequeñas, 0.5-1 mm de ancho y 1-2 mm de largo las cuales se encuentran cubiertas por una testa gruesa que encierra al embrión y esta testa está formada por un tejido muerto, compuesto hasta en un 96% de aire, de tal forma que cada semilla puede ser considerada como un auténtico globo (León y Molina, 2015).

Ver figura 4.

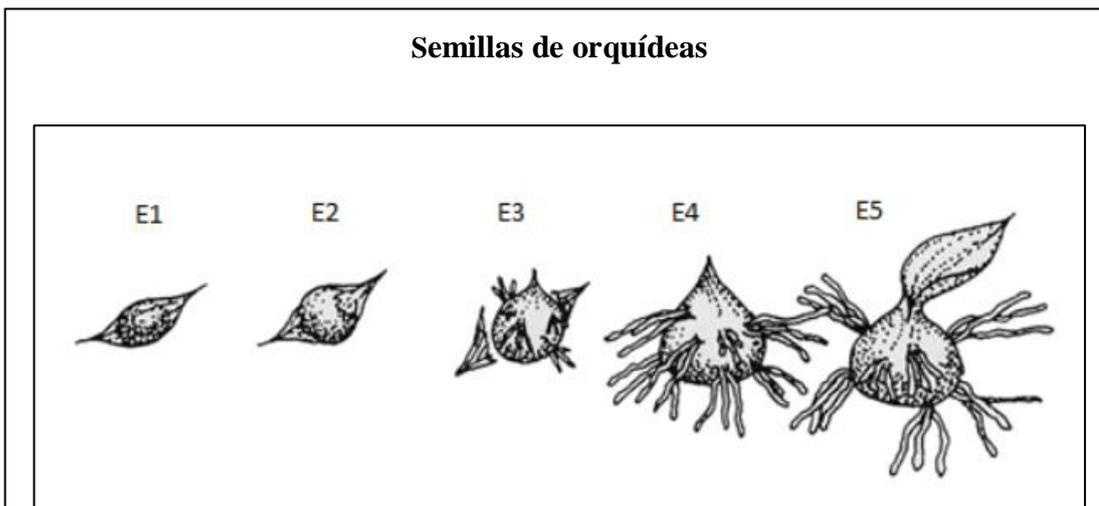


Figura 4. Estadios del desarrollo de protocormos de semillas de orquídeas.

Nota: E1= producción de uno o más rizoides, E2= ruptura del testa, E3= formación de la hoja primordial, E4= aparición de la primera hoja verdadera, E5= elongación de la hoja verdadera y aparición de la raíz.

Fuente: (León & Molina, 2015)

Según Baquero, Meyer, Vieira, y Larsen (2014), existen tres variables para que se establezca una simbiosis funcional y se puedan desarrollar las semillas en un sustrato determinado: 1) los requerimientos por los hongos, 2) la proximidad de las plantas y

3) la disponibilidad de material en investigación. Como cultivo en viveros este género se desarrolla bien en macetas de plástico y al requerir una elevada cantidad de humedad se usa como sustrato musgo (Sinchire, 2010).

1.4.3 Micorrizas

El término micorriza proviene de la fusión de dos palabras: *mykes* que significa hongo y *rhiza* que significa raíz (Hoyos y Rodríguez, 2013). Las orquídeas terrestres tienen asociaciones mutualistas con hongos micorrízicos que se consideran necesarios para la germinación de las semillas y el crecimiento de estas plantas (León y Molina, 2015).

El hábitat de las especies de *Dracula*, usualmente es degradado debido al alto nivel de impacto humano a través de la agricultura, la sobreexplotación de los bosques para el uso comercial de la madera y quema en las tierras altas; estas modificaciones ambientales reduce las posibilidades de establecer interacciones micorrízicas y por lo tanto, afecta el patrón de distribución de las especies de orquídeas (Di Pardo *et al.*, 2015).

Los hongos micorrízicos de las orquídeas forman hifas septadas y estructuras en espiral en las raíces conocidas como pelotones dentro de las células corticales (Baquero *et al.*, 2014). Las asociaciones de micorrizas de especies fúngicas se han clasificado como *Rhizoctonia*, *Ceratorhiza*, *Moniliopsis* y *Epulorhiza*; este último género, *Epulorhiza*, es uno de los géneros más comunes que forman micorrizas con orquídeas terrestres (Di Pardo *et al.*, 2015). Mientras que algunas especies de orquídeas andinas en el Ecuador presentaron hongos micorrízicos en los géneros teleomórficos *Tulasnella* y *Sebacina* (Hoyos y Rodríguez, 2013).

A diferencia de otras plantas una sola cápsula de orquídea puede encerrar hasta dos millones de semillas, y estas al no poseer tejido nutritivo de reserva requieren obligatoriamente asociarse con hongos micorrízicos para la germinación (Sinchire, 2010).

1.4.4 Polinización

Los mecanismos por los cuales las plantas en general atraen a los polinizadores pueden ser diversos y a menudo multimodales, particularmente en sistemas engañosos (Herber, 2014). Las orquídeas *Dracula* no son ninguna excepción, con señales visuales y olfativas que contribuyen al éxito total en atraer visitantes (Policha, 2014).

Uno de los aspectos más interesantes de la naturaleza es comprender el sistema de polinización de las orquídeas, los cuales son muy diversos, lábiles y en la mayoría de los casos la flores de orquídeas atraen a su polinizador por engaño imitando otras flores u organismos, y no se proporciona ninguna recompensa floral como el néctar, granos de polen o aceites (Baquero *et al.*, 2014).

Una de las principales características de la flor de *Dracula* es un labio que se asemeja a una tapa de hongo invertido llamada labelo; por esta razón, se sospecha que las orquídeas de este género imitan a los hongos para atraer a sus polinizadores, insectos que completarían sus ciclos vitales en las setas (Policha *et al.*, 2016).

Estas orquídeas presentan olores característicos poseen una ligera fragancia que recuerda a los hongos y son polinizadas generalmente por moscas de la familia Drosophilidae (Pupulin *et al.*, 2009). Los insectos que se encuentran dentro del orden díptero son relativamente pequeños y específicamente los que se localizan dentro del género *Zygothrica*, eliminan y depositan cargas de polen sobre las especies

de *Dracula* (Policha *et al.*, 2016). Las moscas *Zygothricas* que son superficialmente similares a las moscas de la fruta, completan parte de su ciclo de vida en las superficies de hongos, donde se reproducen, ponen huevos y en algunos casos se alimentan de tejidos de hongos o levaduras (Policha, 2014).

1.5 Diversidad y distribución del género

El género *Dracula* tiene una distribución amplia en el continente Americano, la cual abarca desde México hasta Perú, pero su área excluye tanto las Antillas como Venezuela, Bolivia y Brasil; la mayoría de las especies de *Dracula* se encuentran entre 1500 y 2500 m de altitud, y muy pocas crecen al nivel del mar entre 200 y 300 m que representan tierras bajas y cálidas (Pupulin *et al.*, 2009)

Calderón y Farfán (2003), mencionan que las especies de este género se limitan a los hábitats montanos o submontanos de los Neotrópicos; al ser epífitas se encuentran en bosques maduros, alcanzando su máxima diversidad en los bosques húmedos que cubren las laderas de los Andes occidentales en Colombia y Ecuador.

Algunas especies de *Dracula* tienen rangos amplios de expansión como por ejemplo, *D. vespertilio* que va desde Nicaragua hacia Ecuador, mientras que la mayoría son localmente endémicos (Luer, 1993). *D. vespertilio* se ha encontrado en bosques nubosos primarios no perturbados con alta humedad y luz solar indirecta (Pupulin *et al.*, 2009).

La mayoría de las especies florecen a lo largo del año, con brotes que van desde una sola flor por planta y hasta varias flores por planta, pero también se conoce que para florecer algunas especies lo realizan solamente una vez al año (Luer, 1993). Al menos cuatro especies florecen abundantemente durante la estación lluviosa, particularmente de enero a marzo; por ejemplo, una de las especies es *D. felix*, la cual

es común que las flores permanezcan abundantemente, y a menudo tiene muchas flores presentes al mismo tiempo en pedúnculos individuales (Policha, 2014). Frecuentemente se encuentran en el suelo donde han caído, o en ramas y troncos a 3 m del suelo, solos o en grupos (Policha *et al.*, 2016).

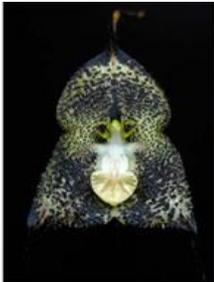
Según The Plant List (2017), existen 130 especies aceptadas dentro del género *Dracula*; Luer (1993) las agrupó en tres subgéneros, cinco secciones y dos subsecciones, ver tabla 2. Según Zambrano y Solano-Gómez (2011), se conocen 72 especies en Colombia y 56 especies en el Ecuador con una mayor concentración en los bosques andinos de estos países, ver tabla 1.

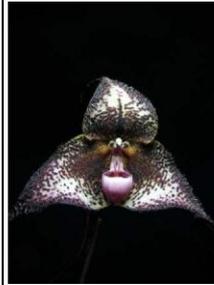
En el Ecuador los registros reportan la distribución de las especies *Dracula* en diferente Provincias; en los andes, *Dracula* se encuentra: en Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Bolívar, Azuay y Loja; en la región costa, algunas especies crecen en las provincias de Esmeraldas, Santo Domingo y El Oro; en las provincias amazónicas, *Dracula* se encuentra en Sucumbíos, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Baquero Rivadeneira y Moncayo Cárdenas, 2017).

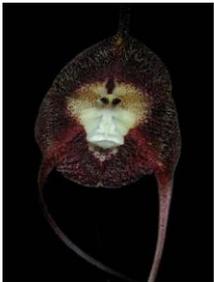
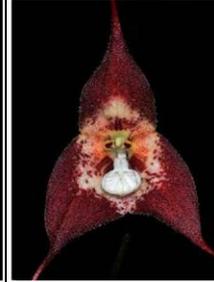
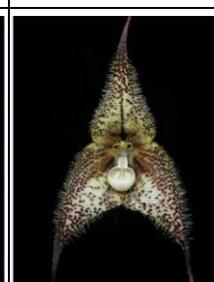
Tabla 1

Especies del género *Dracula* descritas en Ecuador.

| | | | | |
|---|---|---|--|---|
|  |  |  |  |  |
| 1 <i>Dracula alcithoe</i> Luer & R. Escobar | 2 <i>Dracula andreettae</i> (Luer) Luer | 3 <i>Dracula andreettae</i> (Luer) Luer | 4 <i>Dracula chiroptera</i> Luer & Malo | 5 <i>Dracula chiroptera</i> Luer & Malo |

| | | | | |
|---|---|---|--|---|
|  |  |  |  |  |
| 6 <i>Dracula chiroptera</i> Luer & Malo | 7 <i>Dracula chiroptera</i> Luer & Malo | 8 <i>Dracula christineana</i> Luer | 9 <i>Dracula cordobae</i> Luer | 10 <i>Dracula dalessandroi</i> Luer |
|  |  |  |  |  |
| 11 <i>Dracula dalstroemii</i> Luer | 12 <i>Dracula deltoidea</i> (Luer) Luer | 13 <i>Dracula dodsonii</i> (Luer) Luer | 14 <i>Dracula erythrocodon</i> (Luer & Dalstrom) O. Gruss & M. Wolff | 15 <i>Dracula erythrocodon</i> (Luer & Dalstrom) O. Gruss & M. Wolff |
|  |  |  |  |  |
| 16 <i>Dracula felix</i> (Luer) Luer | 17 <i>Dracula fuligifera</i> Luer | 18 <i>Dracula fuliginosa</i> Luer | 19 <i>Dracula gigas</i> (Luer & Andreetta) Luer | 20 <i>Dracula x hawleyi</i> Luer |
|  |  |  |  |  |
| 21 <i>Dracula hirsuta</i> Luer & Andreetta | 22 <i>Dracula hirsuta</i> var. <i>xantina</i> Luer & Andreetta | 23 <i>Dracula hirtzii</i> Luer | 24 <i>Dracula hirtzii</i> var. <i>xantina</i> Luer | 25 <i>Dracula iricolor</i> (Rchb.f.) Luer & R. Escobar |

| | | | | |
|---|---|---|--|---|
|  |  |  |  |  |
| 26 <i>Dracula x kareniae</i> Luer y Dalstrom | 27 <i>Dracula lafleurii</i> Luer & Dalstrom | 28 <i>Dracula lafleurii</i> Luer & Dalstrom | 29 <i>Dracula lafleurii</i> Luer & Dalstrom | 30 <i>Dracula levii</i> Luer |
|  |  |  |  |  |
| 31 <i>Dracula lindstroemii</i> Luer & Dalstrom | 32 <i>Dracula lotax</i> (Luer) Luer | 33 <i>Dracula mantissa</i> Luer & R. Escobar | 34 <i>Dracula marinii</i> Baquero | 35 <i>Dracula marsupialis</i> Luer & Hirtz |
|  |  |  |  |  |
| 36 <i>Dracula marsupialis</i> Luer & Hirtz | 37 <i>Dracula marsupialis</i> Luer & Hirtz | 38 <i>Dracula marsupialis</i> var. <i>xanthina</i> Luer & Hirtz | 39 <i>Dracula mendozae</i> Luer & V.N.M Rao | 40 <i>Dracula mopsus</i> (F. Lehm & Kraenzl.) Luer |
|  |  |  |  |  |
| 41 <i>Dracula morleyi</i> Luer & Dalstrom | 42 <i>Dracula navarroorum</i> Luer & Hirtz | 43 <i>Dracula papillosa</i> Luer y Dodson | 44 <i>Dracula x pinasensis</i> Zambrano & Solano | 45 <i>Dracula polyphemus</i> (Luer) Luer |

| | | | | |
|---|---|---|--|---|
|  |  |  |  |  |
| 46 <i>Dracula portillae</i> Luer & Andreetta | 47 <i>Dracula psyche</i> (Luer & Andreetta) Luer | 48 <i>Dracula rezekiana</i> Luer & Hawle | 49 <i>Dracula sibundoyensis</i> Luer & R. Escobar | 50 <i>Dracula x sijmii</i> Luer |
|  |  |  |  |  |
| 51 <i>Dracula simia</i> (Luer) Luer | 52 <i>Dracula smaug</i> Baquero & Gary Mey | 53 <i>Dracula sodiroi</i> (Schltr.) Luer | 54 <i>Dracula sodiroi</i> (Shltr.) Luer | 55 <i>Dracula soennemarkii</i> Luer & Dalst. Foto: G. Iturralde |
|  |  |  |  |  |
| 56 <i>Dracula terborchii</i> Luer & Hirtz | 57 <i>Dracula trigonopetala</i> Gary Mey. & Baquero | 58 <i>Dracula trinympfarum</i> Luer | 59 <i>Dracula tubeana</i> (Rchb.F) Luer | 60 <i>Dracula ubangina</i> Luer |
|  |  |  |  |  |
| 61 <i>Dracula vampira</i> (Luer) Luer | 62 <i>Dracula venosa</i> (Rolfe) Luer | 63 <i>Dracula vespertilio</i> (Rchb.f.) Luer | 64 <i>Dracula woolwardiae</i> (F. Lehm. ex Kraenzl.) Luer | 65 <i>Dracula woolwardiae</i> (F. Lehm. ex Kraenzl.) Luer |

Nota: En Ecuador se han descrito 55 especies, algunas se repiten en su distinto color.

Fuente: (Baquero Rivadeneira & Moncayo Cárdenas, 2017)

Tabla 2.

Clasificación subgenérica actual del género *Dracula*

| Subgénero | Sección | Subsección | Series | Especies representativas | |
|----------------|---------------------|-----------------|----------------|--|-----------------|
| <i>Xenosia</i> | | | | <i>D. xenos</i> | |
| <i>Sodiroa</i> | | | | <i>D. sodiroi</i> | |
| <i>Dracula</i> | <i>Andreettaea</i> | | | <i>D. andreettae</i> | |
| | <i>Chestertonia</i> | | | <i>D. chestertonii</i> | |
| | <i>Cochliopsia</i> | | | <i>D. cochliops</i> | |
| | <i>Dodsonia</i> | | | <i>D. dodsonii</i> | |
| | <i>Dracula</i> | <i>Costatae</i> | | <i>D. felix</i> | |
| | | | <i>Dracula</i> | <i>Parviflorae</i> | <i>D. lotax</i> |
| | | | | <i>Grandiflorae- parvilabiatae</i> | <i>D. gigas</i> |
| | | | <i>Dracula</i> | <i>D. chimaera</i> | |

Nota: Subgéneros, secciones, subsecciones y series se definieron principalmente por características florales distintivas, así como morfología externa de los ovarios.

Fuente: (Luer, 1993)

1.6 Marcadores moleculares

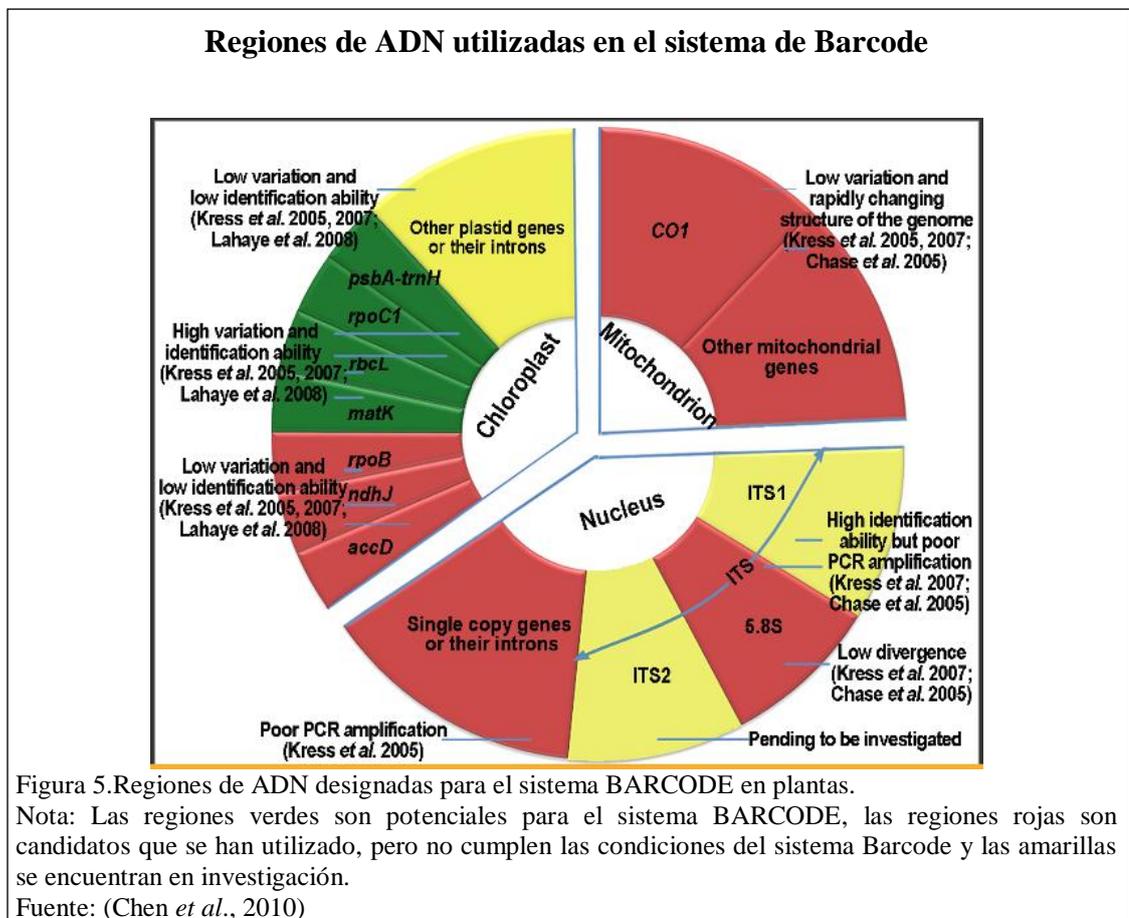
Marcadores moleculares o marcadores genéticos se los entiende como un segmento de ADN ubicados en un lugar específico del genoma, a lo que se le llama locus y esta herencia genética puede ser rastreada; los cuales pueden ser genes codificantes o no codificantes (Azofeifa-Delgado, 2006).

Estos marcadores han aportado información relevante en áreas clave de la conservación *in situ* y *ex situ* (Raya, 2013). Para realizar investigación básica se requiere el uso de los marcadores de ADN; por ejemplo, en el estudio de relaciones filogenéticas, pruebas de paternidad, trazabilidad de los alimentos y búsqueda de genes útiles (Aguilar, 2003).

Las células vegetales contienen tres genomas distintos: el genoma cloroplástico, el genoma mitocondrial y el genoma nuclear; el genoma de la mitocondria y del cloroplasto son de herencia uniparental es decir de una línea materna en las

angiospermas, mientras que el genoma nuclear es biparental que significa de ambos progenitor (Singh, Parveen, Raghuvanshi, y Babbar, 2012).

Los tres tipos de genomas se diferencian por su tamaño, siendo el genoma nuclear el más grande por contener 3 millones de kilobases aproximadamente; en cambio el genoma mitocondrial contiene de 200 a 2500 de kilobases de ADN, el cual es pequeño a comparación del nuclear; por último queda el genoma cloroplástico que varía moderadamente de tamaño entre las especies desde 120 a 217 kilobases de ADN dejando en evidencia que es el más pequeño de los tres genomas (Cuéllar, 2011).



Algunas regiones del genoma del cloroplasto (*atpF-H*, *matK*, *psbK-I*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1* y *trnH-psbA*) han confiado en gran medida para el desarrollo de marcadores candidatos para los códigos de barras de ADN de planta (Dong, Liu, Yu, Wang, y

Zhou, 2012). Estos marcadores son amplificados mediante la técnica PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction) y posterior secuenciación para analizar las variaciones existentes entre organismos (Barthet, Moukarzel, Smith, Patel, y Hilu, 2015).

1.7 Marcadores moleculares en orquídeas

Estudios realizados en plantas se han conducido a la búsqueda de regiones barcode; las regiones plastidio de genes codificantes (*matK*, *rbcL*, *rpoB*, y *rpoC1*) así como también los espaciadores no codificantes (*atpF-atpH*, *trnH-psbA*, y *psbK-psbI*) son las más utilizadas en estudios genéticos (CBOL Plant Working Group *et al.*, 2009). De estos últimos fragmentos no codificantes, el espaciador intergénico *trnH-psbA* del genoma del plastidio así como también el gen codificante *rpoC1* son considerados como los mejores marcadores para la identificación de especies en varios grupos de plantas, debido a su alto porcentaje de sitios polimórficos (Cruz, 2011).

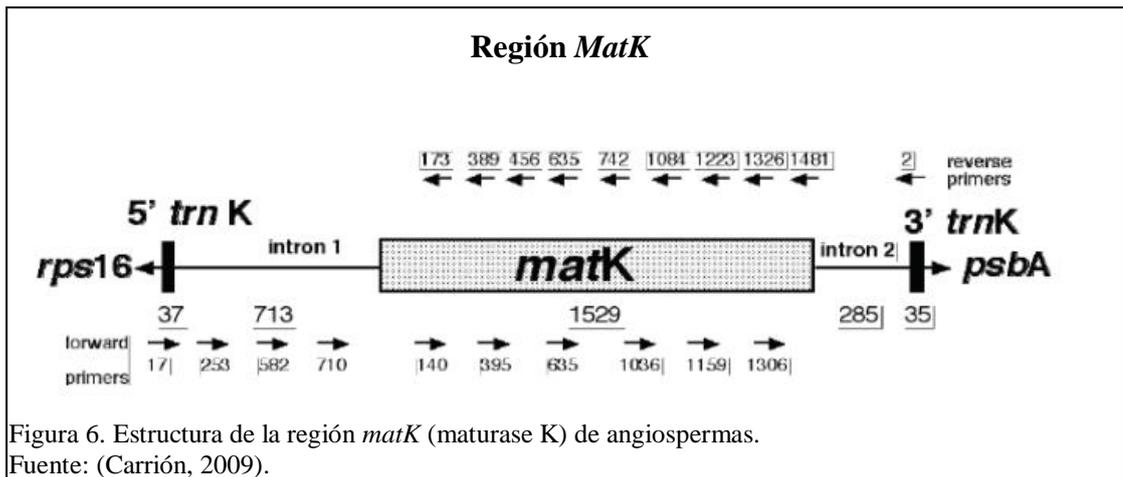
Luo *et al.* (2014) mencionan que algunas regiones como *rbcL*, *rpoB*, y *rpoC1* son útiles para la identificación a nivel de familia y no nivel de especie; con frecuencia son utilizados en los análisis filogenéticos. La región *rpoC1* del genoma plastidio es altamente conservada y útil para estudios filogenéticos, así como también *matK*, que es una de las secciones de codificación más rápida evolución del genoma plastidio (Sánchez, 2016).

1.7.1 Región MatK

En la sistemática de plantas, el gen *matK* se ha surgido recientemente como un gen valioso debido a su signo filogenético alto comparado con otros genes usados en este campo (Barthet *et al.*, 2015). Las 1500pb del gen *matK* están alojadas entre dos intrones que son interrumpidos por los exones 5` y 3` de *trnK* en la larga y singular

copia de cloroplastos de la mayoría de las plantas (Salazar, Chase, Soto Arenas, y Ingrouille, 2003). La región 3` es relativamente conservada y la región 5` menos conservada ofreciendo dos conjuntos de caracteres que se pueden utilizar en diferentes niveles taxonómicos; proporcionando información molecular para resolverse las relaciones filogenéticas de poca profundidad a los niveles más profundos (Dong *et al.*, 2012).

La codificación de la enzima Maturase se da gracias al gen *MatK* que catalizan intrones no autocatalíticos suprimidos por RNAs prematuros; además de ser requeridos para la función normal de la fotosíntesis y para la post transcripción como factor de empalme en los cloroplastos (Luo *et al.*, 2014). Las Inserciones y deleciones son usuales en el gen *matK*, aunque estas alteraciones ocurren principalmente en los múltiplos de tres, manteniendo el marco de lectura (Carión, 2009).



1.7.2 Región *rpoC1*

Conocido como Cadena de ARN polimerasa Beta'; este gen *rpoC1* codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa, el cual participa en el proceso de transcripción de los genes del cloroplasto, así como también presenta las tasas de evolución más altas (Cruz, 2011).

El gen *rpoC1* pertenece a plantas superiores y se integra en los procesos de fotosíntesis al igual que *rpoA*, *rpoB* y *rpoC2* (Lee, Ng, Mahat, Nazre, y Mohamed, 2016).

Los autores Vindas-Rodríguez, Rojas-Jiménez, y Tamayo-Castillo (2011), recomiendan la utilización de *rpoC1* por su buen rendimiento en términos de ser amplificado con una gama limitada de condiciones de PCR y ser los primeros grupos para la discriminación confiable entre especies de diferentes grupos de plantas.

Su tamaño molecular como primer oscila desde los 550 a 750 pares de base evidenciado en la corrida de electroforesis horizontal en geles de agarosa (Niu *et al.*, 2017).

1.7.3 Región *rpoB*

Al igual que el gen *rpoC1* este gen también codifica la subunidad beta del genoma cloroplástico de la ARN polimerasa plastidio codificada por plásto (PEP) que es una enzima nuclear (Cruz, 2011). No se ha explorado completamente, aunque puede ser una herramienta útil para la identificación molecular de las especies vegetales; presenta gran variabilidad a lo largo de las secuencias génicas (Luo *et al.*, 2014).

El tamaño molecular del primer *rpoB* oscila entre un tamaño de 350 y 450 pares de bases evidenciado en la corrida de electroforesis horizontal en geles de agarosa (Niu *et al.*, 2017).

1.8 ADN Barcode

Para la identificación de especies el término “DNA barcode” o “DNA barcoding” fue planteado en el 2003 por Paul Herbert, el cual consiste en un sistema de identificación microgenómico, que facilita la discriminación de especies mediante el

análisis de un fragmento pequeño del ADN; sin embargo, es difícil encontrar una región genómica adecuada para el código de barras de ADN de una amplia gama de taxones (Herber, 2014). De hecho, para que la codificación de códigos de ADN funcione, la variación de la secuencia debe ser suficientemente alta entre las especies para que puedan ser discriminadas entre sí (Lahaye *et al.*, 2008).

El uso de código de barras de ADN para la identificación y taxonomía ha sido discutido, es una herramienta práctica para estudios de biodiversidad, una creciente comunidad científica ha adoptado ADN barcoding, utilizando el gen mitocondrial Cox I (COI), este gen está ahora bien establecida para los animales, pero la búsqueda de un código de barras universal sigue siendo discutido para las plantas (Singh *et al.*, 2012).

En las plantas para establecer su “código de barras” se seleccionan, amplifican y secuencian regiones del ADN del cloroplasto: *matK* y *rbcL* (Massensini Jr., 2013). La secuenciación y alineamiento en la mayoría de las plantas terrestres proporcionan una columna vertebral útil para el conjunto de datos de código de barras (Barthet *et al.*, 2015).

El propósito del barcode es la identificación de especies y especialmente contribuir a descubrir la diversidad de organismos previamente no detectada a nivel de especies (CBOL Plant Working Group *et al.*, 2009). Esta técnica puede aplicarse a materiales fragmentados de plantas y ser utilizado además como auxiliar para determinar la diversidad de especies para estudios de demografía, ecología y análisis forense; por ejemplo, en el análisis forense el aprovechamiento ilegal de plantas puede ser controlado y posteriormente proceder a sanciones legales (Carrión, 2009).

Las regiones de ADN analizadas se amplifican mediante marcadores moleculares específicos a través de la PCR posteriormente se secuencian por medio de la metodología de Sanger de primera generación donde se obtienen secuencias específicas para ser alineadas y analizadas mediante programas bioinformáticos; por último se comparan en una biblioteca referencial de la vida (Rivas y Salazar, 2017).

Los programas bioinformáticos se utilizan para editar errores de montaje, orientación de secuencias correctas, alineación de secuencias; también facilita el análisis basados en caracteres y análisis comparativos de la diversidad de códigos de barras de ADN entre los grupos taxonómicos y regiones geográfica (Luo *et al.*, 2014).

Tabla 3.

Esquema sintético de trabajos comparativos de varios locus propuestos como códigos de barras genéticos en plantas.

| Estudio | Regiones comparadas | Regiones recomendadas |
|----------------------------------|---|---|
| Chase <i>et al.</i> 2007 | <i>rbcL</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>rpoC1</i> , <i>matK</i> , <i>ITS</i> , <i>rpoB</i> | <i>matK</i> + <i>rpoC1</i> + <i>trnH-psbA</i> ó <i>matK</i> + <i>rpoC1</i> + <i>rpoB</i> |
| Newmaster <i>et al.</i> 2008 | UPA, <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>accD</i> | <i>matK</i> + <i>trnH-psbA</i> <i>matK</i> |
| Lahaye <i>et al.</i> 2008 | <i>accD</i> , <i>ndhJ</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> y <i>ycf5</i> | <i>matK</i> (o <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i>) |
| Fazekas <i>et al.</i> 2008 | <i>cox1</i> , 23S <i>rDNA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>atpF-atpH</i> , <i>psbK-psbI</i> | Seleccionar 3 o 4 regiones de: <i>rbcL</i> , <i>rpoB</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>atpF-atpH</i> |
| Carrión 2009 | <i>matK</i> , <i>ITS</i> y <i>trnL-F</i> | <i>matK</i> |
| Hollingsworth <i>et al.</i> 2009 | <i>rpoC1</i> , <i>rpoB</i> , <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>atpF-atpH</i> , <i>psbK-psbI</i> | <i>rbcL</i> + <i>poC1</i> + <i>matK</i> + <i>trnH-psbA</i> |
| CBOL Plant Working Group 2009 | <i>atpF-atpH</i> , <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>psbK-psbI</i> y <i>trnH-psbA</i>) | <i>rbcL</i> + <i>matK</i> |
| Asahina <i>et al.</i> 2010 | <i>rbcL</i> , <i>matK</i> | <i>matK</i> |
| Nicolalde <i>et al.</i> 2010 | <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rpoB</i> , <i>atpF-atpH</i> , <i>psbK-psbI</i> y <i>trnH-psbA</i> , <i>ITS</i> | Ninguna región fue adecuada para Cycaidae |

Fuente: (Cuéllar, 2011)

Capítulo II

2. Materiales y métodos

2.1 Colección muestras

El material genético proviene de 56 especies del género *Dracula*; estas muestras fueron tomadas de especímenes ya identificados morfológicamente en cada una de las colecciones: Dentro del Distrito Metropolitano de Quito (Pichincha) fueron “Orquídeas de Sarina”, “Jardín Botánico de Quito”, “Colección de Beto Guerrero” y “Colección de Alexander Marín”; En Huaca (Carchi) fueron “Colección de Digna Chacón” y “Colección de Guadalupe Utreras”; Por último en el Chical (Carchi) “Colección de Héctor Yela”; totalizando 144 muestras con repeticiones de hasta 3 muestras por especie en diferentes lugares.

El material vegetal recolectado consistió en tejido foliar joven sin daños mecánicos y libres de enfermedades, se almacenaron en bolsas de papel kraft y estas a su vez en bolsas de plástico con cierre hermético con silica gel, para luego ser transportados en un recipiente térmico frío; esto permite que las muestras no se evidenciaran degradadas ni oxidadas desde el sitio de recolección hacia el laboratorio como lo describen Dong *et al.* (2012) esta técnica logra mantener conservadas las muestras en el transporte. Finalmente en el laboratorio fueron almacenados a -20 °C, técnica adaptada de Pérez-Almeida *et al.* (2011).

2.2 Estudio molecular

El estudio molecular se realizó en el Laboratorio de CIENCIAS DE LA VIDA de la Universidad Politécnica Salesiana, campus El Girón, ubicado en la ciudad de Quito durante el período marzo - diciembre del 2017.

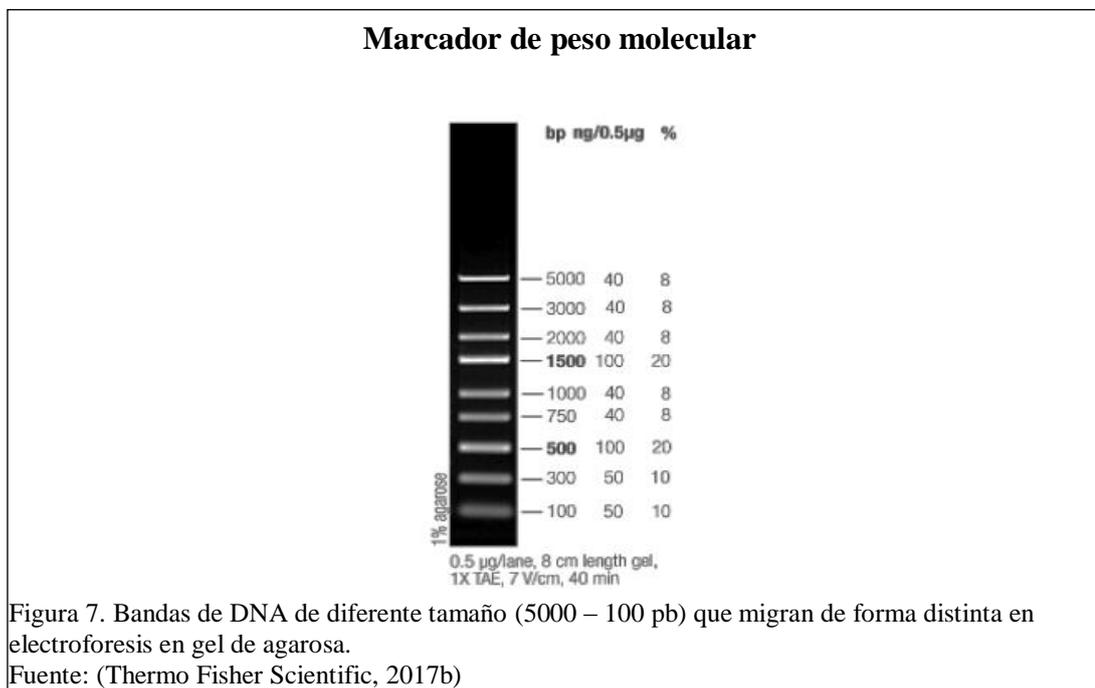
2.2.1 Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987), modificado por Massensini Jr. (2013); este protocolo de extracción química simple de ADN foliar se resume en lo siguiente: Inicia con 20-30 mg de muestra pulverizada en nitrógeno líquido contenida en microtubos (2 mL), se añade 600 μ L de Buffer de Lisis (100mM TrisCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8) y 500 mM NaCl) después se agitan los tubos hasta homogenizar la mezcla, luego se añade 94 μ L de Dodecilsulfato sódico (SDS 10%) y se mezcla por inversión de 5 a 8 veces, una vez que la coloración se torna verdosa se calienta la solución durante 10 minutos a 65°C en un termo bloque; a continuación se añade 118.5 μ L de acetato de potasio (5M), se mezcla por inversión de 5 a 8 veces y luego por 5 min se deja en refrigeración; transcurrido el tiempo se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos, se forman 2 fases y se transfiere el sobrenadante a un nuevo microtubo (2 mL) incluyendo los micelios flotantes, luego se añade 600 μ L de fenol: cloroformo (1:1) y se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos; en este paso con las dos fases formadas se procura tener cuidado con las proteínas precipitadas, insertando la pipeta en la zona media de la fase superior, se transfiere 250 μ L a un nuevo microtubo (1.5 mL), después se añade 360 μ L de isopropanol frío, agitando levemente por inversión de 5 a 8 veces, luego se almacena a -20°C por 3 horas o toda la noche; transcurrido el tiempo las muestras son centrifugadas por 3 minutos a 13 000 rpm, se observa un pellet en la base del microtubo, se elimina el sobre nadante mediante inversión, se realizan tres lavados añadiendo 400 μ L de etanol (70%) y centrifugando cada vez por 3 minutos a 13000 rpm, finalmente con la ayuda del termo bloque a 37°C se evapora el alcohol restante y se resuspende el pellet en 30 μ L de TE 1X (10mM TrisCl (pH 8) y 1 mM EDTA) y se almacena a -20°C.

2.2.2 Cuantificación de ADN

Se procedió a verificar la presencia y calidad de ADN mediante la técnica bioquímica electroforética horizontal en gel de agarosa al 1%, para esto se colocó en cada uno de los pocillos la mezcla compuesta de: 4 μL de la solución de ADN extraído y 5.0 μL de amortiguador de carga (cianol de xileno 6X loading solution)(Raya, 2013). El amortiguador de separación del ADN fue TBE 1X (TBE 10X: Tris base 54 g; ácido bórico 27.5 g y (EDTA 0.5 M, 2.93 g aforado a un litro) pH8); la electroforesis se llevó a cabo a 90 Voltios durante 40 min y el gel fue teñido con 0.5 μL del colorante fluorescente (SybrSafe de Invitrogen) por cada 50 (mL) de gel de agarosa, para luego ser revelado en el fotodocumentador (MicroBis DNR Bio-Imaging Systems) técnica descrita por Aguilar (2003); Healey, Furtado, Cooper y Robert (2014).

Para determinar el tamaño de la cadena de ADN y la concentración aproximada se comparó con las bandas de un marcador molecular de 100 a 5000 bp y de 40 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, 2017b).



2.2.3 Amplificación de ADN

Se amplificaron las regiones de AND cloroplástico *matK*, *rpoC1* y *rpoB* detallados en la tabla 6; las amplificaciones se realizaron en dos rondas; la primera mediante el uso de Dream Taq Green PCR Master mix (2x) de Thermo Fisher Scientific (2017a), ver tabla 4; cuando no era exitosa la primera amplificación se utilizaba el kit Phire Plant Direct PCR Master de Thermo Fisher Scientific (2017b), ver tabla 5; este proceso se realizó en el termociclador convencional (MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler). Se utilizó también dentro de la master mix sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 2%, para reducir los problemas relacionados con la estructura secundaria y la eficacia de la unión del cebador de PCR como lo mencionan Salazar *et al.* (2003).

Tabla 4.

Preparación de la mezcla PCR con Green PCR Master mix (2x)

| Reactivo/Concentración | Volumen para 1 muestra | Volumen para 13 muestras |
|---|------------------------|--------------------------|
| Green PCR Master mix (2x) | 12.5 µL | 162.5 |
| Primer Forward (10 µM) | 0.5 µL | 6.5 |
| Primer Reverse (10 µM) | 0.5 µL | 6.5 |
| DMSO Sulfóxido de dimetilo al (2%) | 0.5 uL | 6.5 |
| Agua libre de ARNasas | 10 µL | 130 |
| ADN | 1 µL | 1 µL para cada muestra |
| Total | 25 µL | 325 µL |

Nota: Cantidades para cada reacción de PCR.
Fuente: (Thermo Fisher Scientific, 2017a)

Tabla 5.

Preparación de la mezcla PCR con Phire Plant Direct PCR Master Mix

| Reactivo/Concentración | Volumen para 1 muestra | Volumen para 13 muestras |
|--|------------------------|--------------------------|
| Phire Plant Direct PCR Master Mix | 12.5 µL | 162.5 µL |
| Primer Forward (10 µM) | 0.5 µL | 6.5 µL |
| Primer Reverse (10 µM) | 0.5 µL | 6.5 µL |
| Disolution | 1.25 µL | 16.25 µL |
| Agua libre de ARNasas | 9.25 µL | 120.25 µL |
| ADN | 1 µL | 1 µL para cada muestra |
| Total | 25 µL | 325 µL |

Nota: Cantidades para cada reacción de PCR
Fuente: (Thermo Fisher Scientific, 2017b)

Las amplificaciones de ADN cloroplástico se realizó a una temperatura de hibridación de 53 °C, después de probar un rango entre 50 y 53 °C. Las mismas condiciones de temperatura en el termociclador se aplicaron a los 3 los marcadores *matK*, *rpoC1*, *rpoB* las cuales fueron:

1min a 94 °C, 30 ciclos de: (30 seg a 94 °C; 40 seg a 52-53 °C; 40 seg a 72 °C) y 5 min a 72 °C. Ver anexo 1.

Tabla 6.

Primers utilizados para la amplificación de regiones cloroplásticas de ADN.

| Primers | Secuencia (5' -> 3') | Referencias |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| matK-1RKIM (F) | ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC | (Saarela et al., 2013) |
| matK-3FKIM (R) | CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG | |
| rpoB – 246 SY14015221-019 (F) | AAGTGCATTGTTGGAAGTGG | (Singh et al., 2012) |
| rpoB – 246 SY14015221-020 (R) | CCGTATGTGAAAAGAAGTATA | |
| rpoC – 246 SY140135221-017 (F) | GTGGATACTTCTTGATAATGG | (Siripiyasing et al., 2012) |
| rpoC – 246 SY140136610-006 (R) | TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC | |

Nota: (F) Secuencia Forward y (R) Secuencia Reverse.

Fuente: (El Autor, 2017)

Los resultados de la amplificaciones de PCR se examinaron por medio de electroforesis horizontal, cada reacción se la analizó con 4µL de producto de PCR + 5 µL de Tampón de carga 6X (cyanol de xileno 0.4% + sacarosa 6.6%) en geles de Agarosa al 1% teñido con el fluoróforo (SYBR Safe de invitrogen) (10 µL en 100 mL), la cámara electroforética se programó a 90 V, 300 mA y 40 min; y el gel obtenido se visualizó bajo luz UV del fotodocumentador (MicroBis DNR Bio-Imaging Systems) técnica descrita por Raya (2013).

2.2.4 Secuenciación

Los productos amplificados fueron diluidos a una concentración de 20 ng/μL, se dispensó la cantidad de 20 μL en nuevos microtubos (1.5 mL) respectivamente etiquetados; se envolvieron con parafilm y finalmente se sellaron al vacío en fundas ziploc para ser enviados a la empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea); donde fueron purificados y secuenciados mediante la técnica simple Sanger automatizada (Macrogen, 2017).

2.2.5 Filogenia

Se procedió a revisar la calidad de las secuencias recibidas mediante el programa FinchTV v.1.4, creado por Geospiza (2012). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software MEGA v. 6.0 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, y Kumar, 2013); se alinearon bajo el sistema MUSCLE con los parámetros predeterminados, los arboles filogenéticos se construyeron con el método estadístico Neighbor-Joining, Bootstrap con 1000 réplicas y el modelo Jukes-Cantor para evaluar las sustituciones nucleotídicas, el cual es un modelo sencillo que estima la distancia entre secuencias y asume la misma frecuencia para los cuatro nucleótidos, así como las probabilidades de sustitución de las cuatro bases; técnica basado en el trabajo de Wilson *et al.* (2017).

Se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de GenBank para realizar una comparación de las regiones *matK*, *rpoC1* y *rpoB*, determinando las posibles especies a las que pertenecen las secuencias que se obtuvieron. De igual manera se analizaron en la base de datos de identificación de BOLDSsystems (Barcode of Life Systems) que es la herramienta de identificación por defecto para

los códigos de barras mediante la comparación de las secuencias almacenadas en esta biblioteca (BOLDSYSTEMS, 2017).

Se eligió como grupo externo a los géneros *Masdevallia*, *Diodonopsis* y *Rhynchostele* de la familia (Orchidaceae), estas secuencias fueron bajadas del GenBank las cuales sirvieron para la comparación y enraizamiento de las secuencias obtenidas estimando caracteres similares; con ello se asume que los caracteres que se hallan en los grupos externos son más parecidos a las secuencias restantes del grupo a analizar (grupo interno) por la divergencia que existe entre ambos, de acuerdo con lo descrito por Carrión (2009).

2.3 Georreferenciación:

Las coordenadas geográficas fueron descargadas de la base de datos Tropicos (2017) y estos datos se procesaron en el programa DIVA-GIS v.7 (Hijmans *et al.*, 2004). Se realizó un mapeo y análisis de datos geográficos para correlacionar los datos filogenéticos con los datos geográficos; se analizó la ubicación, elevación y distribución de los sitios donde se observan especies del género *Dracula*; técnica basada en Cetzal-Ix *et al.* (2016).

Capítulo III

3. Resultados y Discusión

3.1 Colección de muestras

El muestreo en 7 lugares permitió recolectar las 56 especies del género *Dracula* descritas en el Ecuador, en total se tomaron 144 muestras donadas por coleccionistas, así: en el Distrito Metropolitano de Quito (Pichincha), se colectó 27 muestras del jardín botánico “Orquídeas de Sarina”, 20 muestras del “Jardín Botánico de Quito”, 35 muestras de la colección del señor Beto Guerrero y 36 muestras de la colección del señor Alexander Marín; en la localidad de Huaca (Carchi) se colectó muestras de 9 especies de la colección de la Sra. Digna Chacón, 12 muestras de la colección de la Sra. Guadalupe Utreras, finalmente se tomaron 6 muestras de la colección del Sr. Héctor Yela” en la comunidad Quishul parroquia Chical (Carchi), ver Tabla 7.

Tabla 7.

Listado de todas las especies *Dracula* (Orchidaceae) colectadas para este estudio

| NÚMERO DE MUESTRA | CÓDIGO DE COLECCIÓN | NOMBRE CIENTÍFICO | LUGAR DE COLECCIÓN | PROVINCIA | FECHA |
|-------------------|---------------------|------------------------------------|--------------------------|-----------|------------|
| 1 | 3635 | <i>Dracula alcithoe</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 2 | 3724 | <i>Dracula alcithoe</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 3 | 3482 | <i>Dracula andreetae</i> | Digna Chacón | Carchi | 29/05/2017 |
| 4 | 3489 | <i>Dracula andreetae</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 5 | 3559 | <i>Dracula andreetae</i> | Héctor Yela | Carchi | 29/09/2017 |
| 6 | 3537 | <i>Dracula andreetae x xantina</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 7 | 3565 | <i>Dracula bella</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 8 | 3608 | <i>Dracula bella</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 9 | 3411 | <i>Dracula chimaera</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 10 | 3417 | <i>Dracula chimaera</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 11 | 3483 | <i>Dracula chimaera</i> | Digna Chacón | Carchi | 30/05/2017 |
| 12 | 3567 | <i>Dracula chimaera</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 13 | 3552 | <i>Dracula chiroptera</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 14 | 3413 | <i>Dracula cordobae</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |

| | | | | | |
|----|------|-------------------------------------|--------------------------|-----------|------------|
| 15 | 3653 | <i>Dracula cordobae</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 16 | 3442 | <i>Dracula dalessandroi</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 17 | 3487 | <i>Dracula dalstroemii</i> | Digna Chacón | Carchi | 03/06/2017 |
| 18 | 3490 | <i>Dracula dalstroemii</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 19 | 3693 | <i>Dracula dalstroemii</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 20 | 3574 | <i>Dracula deltoidea</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 21 | 3672 | <i>Dracula deltoidea</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 22 | 3535 | <i>Dracula dodsonii</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 23 | 3586 | <i>Dracula dodsonii</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 24 | 3638 | <i>Dracula dodsonii</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 25 | 3412 | <i>Dracula erytrocodon</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 26 | 3572 | <i>Dracula erytrocodon</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 27 | 3410 | <i>Dracula felix</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 28 | 3708 | <i>Dracula felix</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 29 | 3429 | <i>Dracula fuligifera</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 30 | 3636 | <i>Dracula fuligifera</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 31 | 3493 | <i>Dracula fuliginosa</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 32 | 3481 | <i>Dracula gigas</i> | Digna Chacón | Carchi | 28/05/2017 |
| 33 | 3494 | <i>Dracula gigas</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 34 | 3495 | <i>Dracula gigas</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 35 | 3419 | <i>Dracula gigas (amarilla)</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 36 | 3619 | <i>Dracula gigas (negra)</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 37 | 3408 | <i>Dracula gigas (rosada)</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 38 | 3612 | <i>Dracula gigas (amarilla)</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 39 | 3532 | <i>Dracula hirsuta</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 40 | 3578 | <i>Dracula hirsuta</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 41 | 3624 | <i>Dracula hirsuta</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 42 | 3600 | <i>Dracula hirsuta var. Xantina</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 43 | 3524 | <i>Dracula hirtzii</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 44 | 3583 | <i>Dracula hirtzii</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 45 | 3670 | <i>Dracula hirtzii</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 46 | 3523 | <i>Dracula hirtzii var. Xantina</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 47 | 3444 | <i>Dracula inaequalis</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 48 | 3426 | <i>Dracula iricolor</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 49 | 3488 | <i>Dracula iricolor</i> | Digna Chacón | Carchi | 04/06/2017 |
| 50 | 3563 | <i>Dracula iricolor</i> | Jardín Botánico de | Pichincha | 02/10/2017 |

| | | | Quito | | |
|----|------|--------------------------------------|--------------------------|-----------|------------|
| 51 | 3533 | <i>Dracula lafleurii</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 52 | 3669 | <i>Dracula lafleurii</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 53 | 3498 | <i>Dracula levii</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 54 | 3544 | <i>Dracula lindstroemii</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 55 | 3538 | <i>Dracula lotax</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 56 | 3632 | <i>Dracula lotax</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 57 | 3579 | <i>Dracula lotax x adriane</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 58 | 3548 | <i>Dracula mantissa</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 59 | 3675 | <i>Dracula mantissa</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 60 | 3520 | <i>Dracula marinii</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 61 | 3585 | <i>Dracula marinii</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 62 | 3590 | <i>Dracula marinii</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 63 | 3428 | <i>Dracula marsupialis</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 64 | 3484 | <i>Dracula marsupialis</i> | Digna Chacón | Carchi | 31/05/2017 |
| 65 | 3551 | <i>Dracula marsupialis</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 66 | 3555 | <i>Dracula marsupialis</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 67 | 3564 | <i>Dracula marsupialis</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 68 | 3549 | <i>Dracula marsupialis x xantina</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 69 | 3610 | <i>Dracula mendozae</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 70 | 3623 | <i>Dracula mendozae</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 71 | 3667 | <i>Dracula mopsus</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 72 | 3545 | <i>Dracula morleyi</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 73 | 3626 | <i>Dracula morleyi</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 74 | 3409 | <i>Dracula navarrorum</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 75 | 3427 | <i>Dracula navarrorum</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 76 | 3615 | <i>Dracula papillosa</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 77 | 3617 | <i>Dracula papillosa</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 78 | 3527 | <i>Dracula polyphemus</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 79 | 3749 | <i>Dracula portillae</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 80 | 3405 | <i>Dracula psyche</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 81 | 3425 | <i>Dracula psyche</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 82 | 3573 | <i>Dracula psyche</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 83 | 3625 | <i>Dracula psyche</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 84 | 3404 | <i>Dracula radiella</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 85 | 3570 | <i>Dracula radiella</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 86 | 3421 | <i>Dracula rezeckiana</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 87 | 3521 | <i>Dracula rezeckiana</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |

| | | | | | |
|-----|-------|---|--------------------------|-----------|------------|
| 88 | 3613 | <i>Dracula rezeckiana</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 89 | 3536 | <i>Dracula sibundoyensis</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 90 | 3717 | <i>Dracula sibundoyensis</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 91 | 3582B | <i>Dracula sibundoyensis</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 92 | 3400 | <i>Dracula simia</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 93 | 3401 | <i>Dracula simia</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 94 | 3542 | <i>Dracula simia/D. alcithoe</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 95 | 3576 | <i>Dracula smaug</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 96 | 3403 | <i>Dracula sodiroi</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 97 | 3500 | <i>Dracula sodiroi</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 98 | 3584 | <i>Dracula sodiroi</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 99 | 3526 | <i>Dracula soennemarkii</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 100 | 3414 | <i>Dracula sp.</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 101 | 3424 | <i>Dracula sp.</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 102 | 3491 | <i>Dracula sp.</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 103 | 3492 | <i>Dracula sp.</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 104 | 3496 | <i>Dracula sp.</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 105 | 3499 | <i>Dracula sp.</i> | Guadalupe Utreras | Carchi | 27/05/2017 |
| 106 | 3530 | <i>Dracula sp.</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 107 | 3541 | <i>Dracula sp.</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 108 | 3553 | <i>Dracula sp.</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 109 | 663 | <i>Dracula sp.</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 21/07/2017 |
| 110 | 3554 | <i>Dracula sp.</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 111 | 3557 | <i>Dracula sp.</i> | Héctor Yela | Carchi | 29/09/2017 |
| 112 | 3558 | <i>Dracula sp.</i> | Héctor Yela | Carchi | 29/09/2017 |
| 113 | 3562 | <i>Dracula sp.</i> | Héctor Yela | Carchi | 29/09/2017 |
| 114 | 3486 | <i>Dracula sp.</i> | Digna Chacón | Carchi | 02/06/2017 |
| 115 | 3569 | <i>Dracula syndactyla</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 116 | 3485 | <i>Dracula terborchii</i> | Digna Chacón | Carchi | 01/06/2017 |
| 117 | 3525 | <i>Dracula terborchii</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 118 | 3528 | <i>Dracula trigonopetala</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 119 | 3560 | <i>Dracula trigonopetala</i> | Héctor Yela | Carchi | 29/09/2017 |
| 120 | 3618 | <i>Dracula trigonopetala</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 121 | 3422 | <i>Dracula tsubotae/D. christineana</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 122 | 3740 | <i>Dracula tsubotae/D. christineana</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |

| | | | | | |
|-----|------|------------------------------------|--------------------------|-----------|------------|
| 123 | 3531 | <i>Dracula tubeana</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 124 | 3695 | <i>Dracula tubeana</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 125 | 3529 | <i>Dracula ubangina</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 126 | 3646 | <i>Dracula ubangina</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 127 | 3402 | <i>Dracula vampira</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 128 | 3480 | <i>Dracula vampira</i> | Digna Chacón | Carchi | 27/05/2017 |
| 129 | 3547 | <i>Dracula venosa</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 130 | 3566 | <i>Dracula venosa</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 131 | 3577 | <i>Dracula verticulosa xantina</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 132 | 3441 | <i>Dracula vespertilio</i> | Orquideario de Sarina | Pichincha | 22/03/2017 |
| 133 | 3561 | <i>Dracula vespertilio</i> | Héctor Yela | Carchi | 29/09/2017 |
| 134 | 3703 | <i>Dracula vespertilio</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 135 | 3534 | <i>Dracula woolwardiae</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 136 | 3550 | <i>Dracula x felix</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 137 | 3546 | <i>Dracula x hawleyi</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 138 | 3593 | <i>Dracula x hawleyi</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 139 | 3540 | <i>Dracula x Kareniae</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 140 | 3571 | <i>Dracula x kareniae</i> | Jardín Botánico de Quito | Pichincha | 02/10/2017 |
| 141 | 3611 | <i>Dracula x kareniae</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 142 | 3627 | <i>Dracula x kareniae</i> | Alexander Marín | Pichincha | 12/11/2017 |
| 143 | 3522 | <i>Dracula x pinasensis</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |
| 144 | 3539 | <i>Dracula x sijmii</i> | Beto guerrero | Pichincha | 08/09/2017 |

Nota: Especies descritas como ecuatorianas según Baquero Rivadeneira y Moncayo Cárdenas (2017); Pupulin *et al.* (2009).

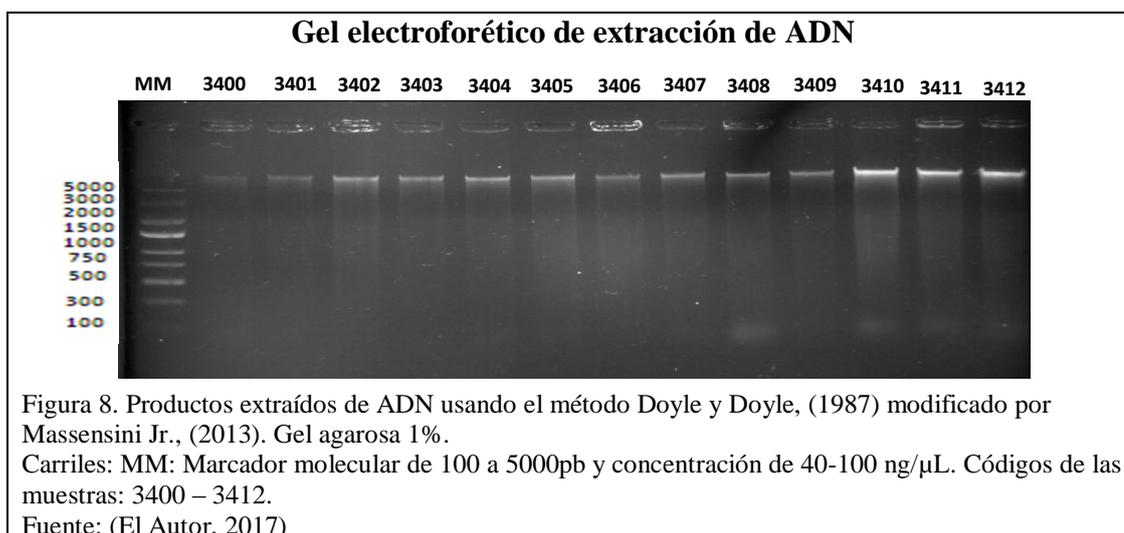
Fuente: (El Autor, 2017)

3.2 Estudio Molecular

3.2.1 Extracción de ADN:

El protocolo de extracción demostró un éxito del 100% al obtener ADN de las 144 muestras, anexo 2; Cuéllar (2011) obtuvo resultados similares logrando obtener ADN de calidad para la realización de los análisis posteriores; según Aguilar (2003) la extracción de ADN de muestras procedentes de material fresco es sencillo, gracias a que las paredes celulares del tejido joven son fáciles de romper lo que permite una mejor extracción de ADN.

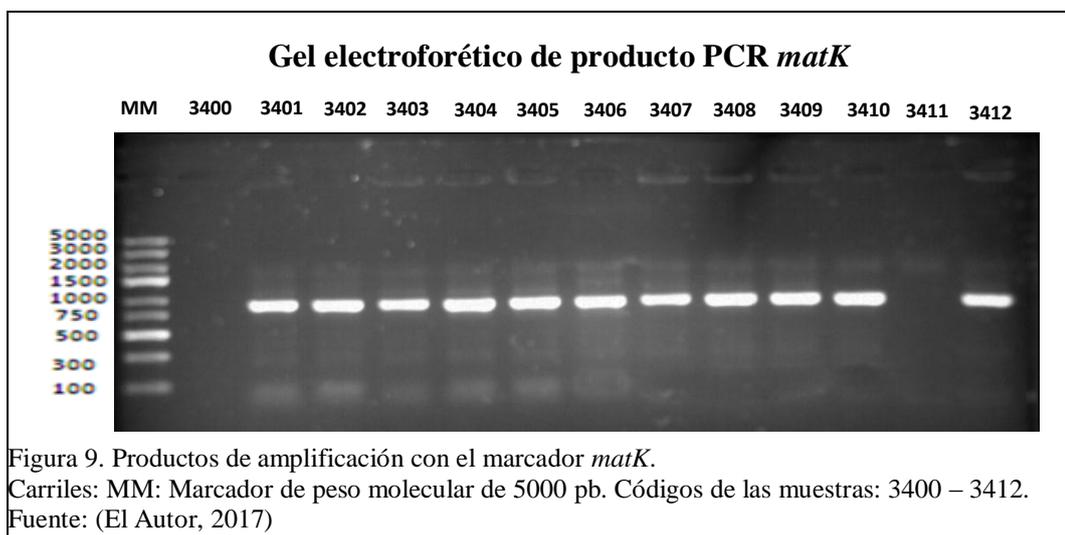
En la corrida electroforética de ADN las muestras no presentaron degradación a pesar de que en ciertos carriles se pueden observar pequeñas cantidades de contaminación tales como ARN, polisacáridos, lípidos y fenoles. En las bandas obtenidas de la figura 8 se evidencian cadenas de ADN de más de 5000 pb y una concentración de 40-100 ng/μL aproximadamente, este resultado es similar al obtenido por Massensini Jr. (2013) en su filogenia molecular de *Acianthera Scheidw.*



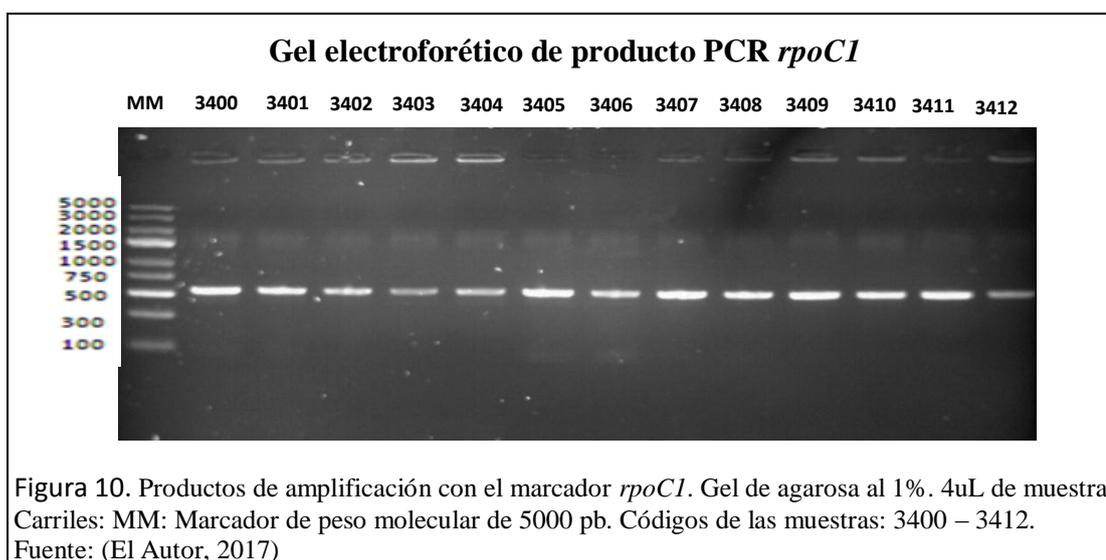
3.2.2 Amplificación

Se amplificó el 100% de las muestras con el marcador molecular *matK*, el 70% con el marcador molecular *rpoC1* y el 76 % de las muestras con el marcador molecular *rpoB*, ver anexo 2. La temperatura de hibridación para los cebadores *matK*, *rpoC1* y *rpoB* fue de 53 °C y el programa en el Termociclador de 1min a 94 °C, 30 ciclos (30 seg a 94 °C, 40 seg a 53 °C, 40 seg a 72 °C) y 5 min a 72 °C.

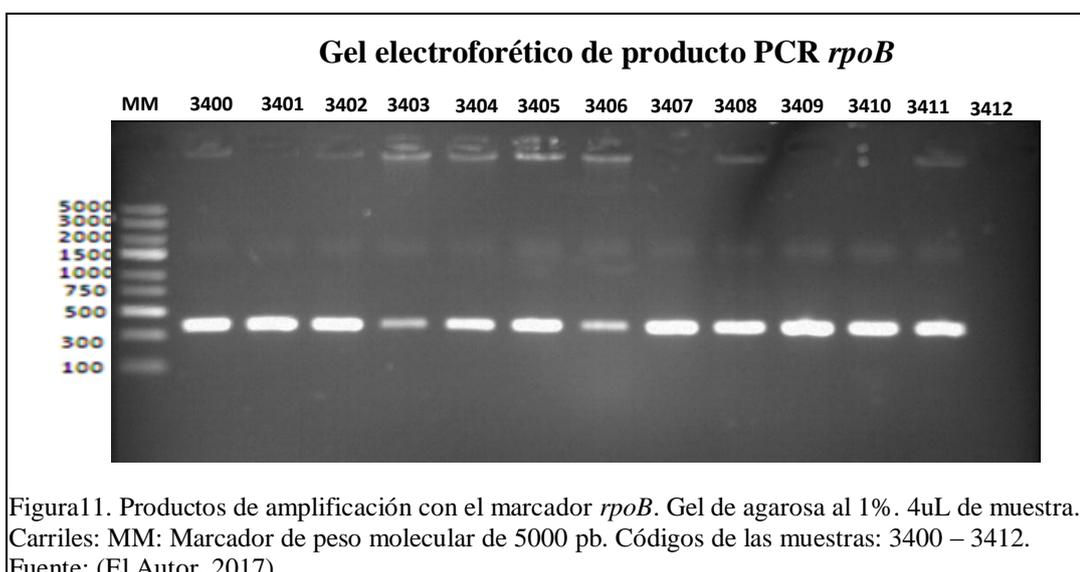
Las bandas obtenidas en la figura 9 con el marcador *matK* demuestran cadenas de 750 – 1000 pb y una concentración entre 20 – 100 ng/μL, estos resultados son similares a los obtenidos por Meyer y Cameron (2009).



Las bandas obtenidas en la figura 10 con el marcador *rpoC1* demuestran cadenas de 500 – 750 pb y una concentración entre 20 – 100ng/μL, según Siripiyasing *et al.* (2012) estos resultados se asemejan a los obtenidos en su estudio.



Las bandas obtenidas en la figura 11 presentaron cadenas entre 300 – 500 pb y una concentración entre 20 – 100ng/μL, estos resultados son similares a los obtenidos por Singh *et al.* (2012).



3.2.3 Secuenciación

Los productos PCR fueron purificados y secuenciados con el método Sanger en la empresa Macrogen (Seoul-Korea), para la región *matK* se enviaron 144 muestras y se obtuvo 124 secuencias de buena calidad, determinadas por el programa FinchTV al analizar los electroferogramas de ADN, de igual manera para la región *rpoC1* se enviaron 101 muestras y se obtuvo 75 secuencias, finalmente para la región *rpoB* se enviaron 109 muestras y se obtuvo 91 secuencias de buena calidad, ver anexo 2.

3.2.4 Análisis de secuencias

Se compararon las secuencias *matK*, *rpoC1* y *rpoB* con las secuencias del GenBank; se pudo determinar que en esta base de datos sólo existieron 3 especies del género *Dracula* para el marcador *matK* y ninguna secuencia para los marcadores *rpoC1* y *rpoB*; No fue útil la comparación debido a que las secuencias obtenidas en este estudio son nuevas para esta base de datos.

La otra base de datos de identificación para los códigos de barras BOLDSystems (Barcode of Life Systems) sólo sirvió para comparar las secuencias con el marcador *matK* ya que con los otros marcadores *rpoB* y *rpoC1* no existió información; Los únicos resultados positivos para validar el estudio con especies del género *Dracula*

fueron con las especies *D. hirtzii* y *D. felix* que mostraron una similitud del 100% y una puntuación >700 con las únicas especies *D. hirtzii* y *D. felix* subidas su barcode en BOLDSystems.

En vista de la ausencia de secuencias de especies del género *Dracula* en las bases de datos BOLDSystems y GenBank se ha planteado a futuro subir la información obtenida en esta investigación como un aporte científico de la Universidad Politécnica Salesiana.

3.2.5 Filogenia

El árbol filogenético obtenido con el marcador molecular *matK* se pudo distinguir los principales grupos de especies de *Dracula*, llegando a diferenciar grupos a nivel de subsección, la información obtenida por la región *matK* presentó un 60% de similitud a la clasificación subgenérica propuesta por Luer (1993), esta región según Dong et al. (2012), posee una variabilidad nucleotídica baja haciendo que su grado de conservación aumente. Ver gráfico 12.

El árbol filogenético obtenido con el marcador molecular *rpoC1*, las especies se agrupan en 8 clados que dificulta su interpretación y que no se puede discutir con lo propuesto por (Luer, 1993), debido a que la región *rpoC1* no es discriminativo para diferenciar la clasificación subgenérica de *Dracula*, y según Cruz (2011), este marcador no presenta mayor variación. Ver figura 13.

El árbol filogenético obtenido con el marcador molecular *rpoB*, las especies se agruparon en 6 clados sin resolver, lo que demuestra que *rpoB* no es discriminativo para diferenciar la clasificación subgenérica de *Dracula* y según Sánchez (2016), no presenta mayor variación para discriminar entre especies. Ver figura 14.

Árbol filogenético Neighbor-Joining región *rpoC1* del género *Dracula*

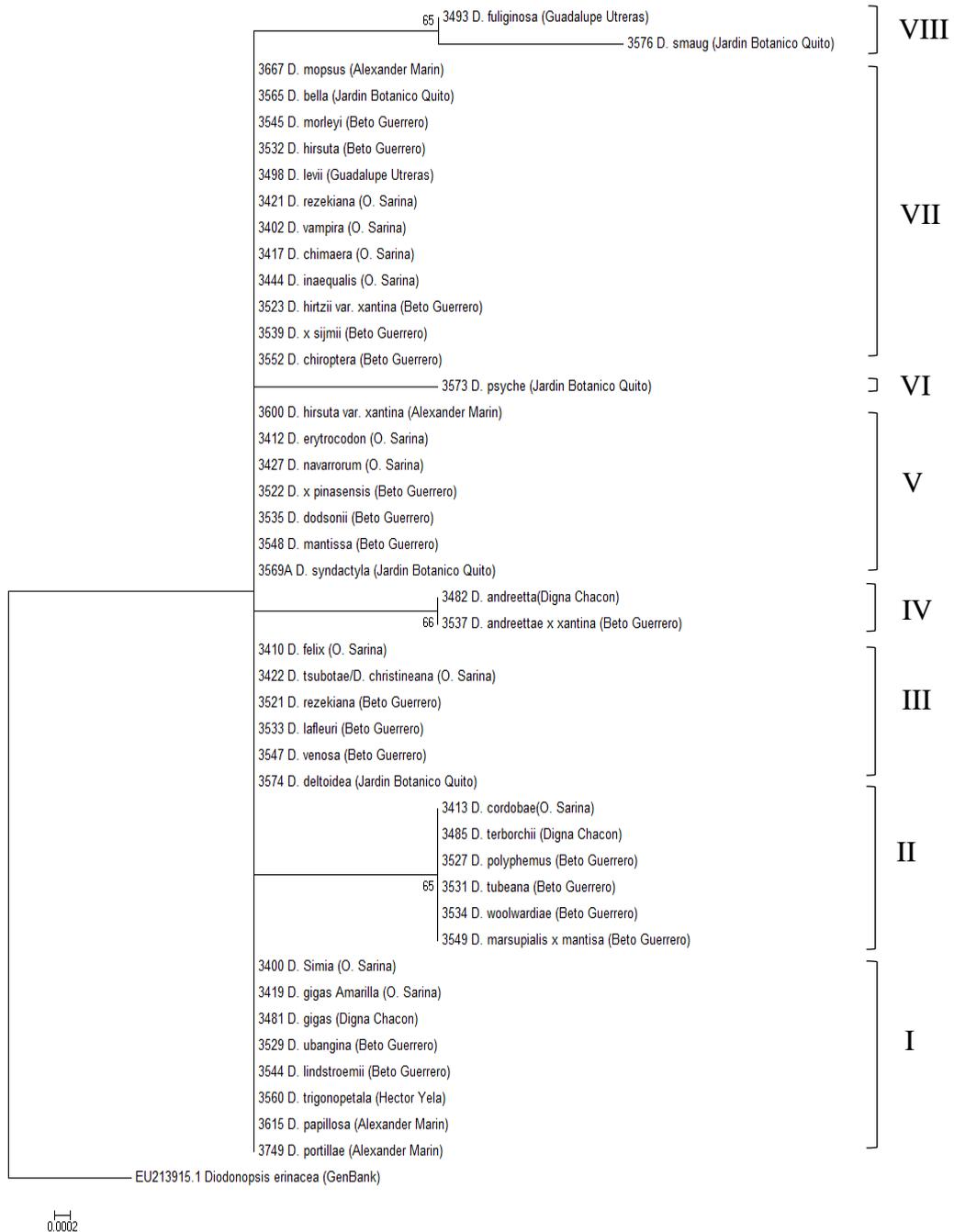


Figura 13. Árbol filogenético Neighbor-Joining de la región *rpoC1* mediante el método Jukes-Cantor y bootstrap de 1000 réplicas.

Nota: El análisis involucró 45 secuencias de nucleótidos de las cuales *Diodonopsis erinaceae* es una secuencia tomada del Genbank. Las especies del género *Dracula* se agrupan en 8 clados sin revolver, lo que demuestra que *rpoC1* no es discriminativo para diferenciar la clasificación subgenérica de *Dracula*.

Fuente: Datos procesados con el software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

Árbol filogenético Neighbor-Joining región *rpoB* del género *Dracula*

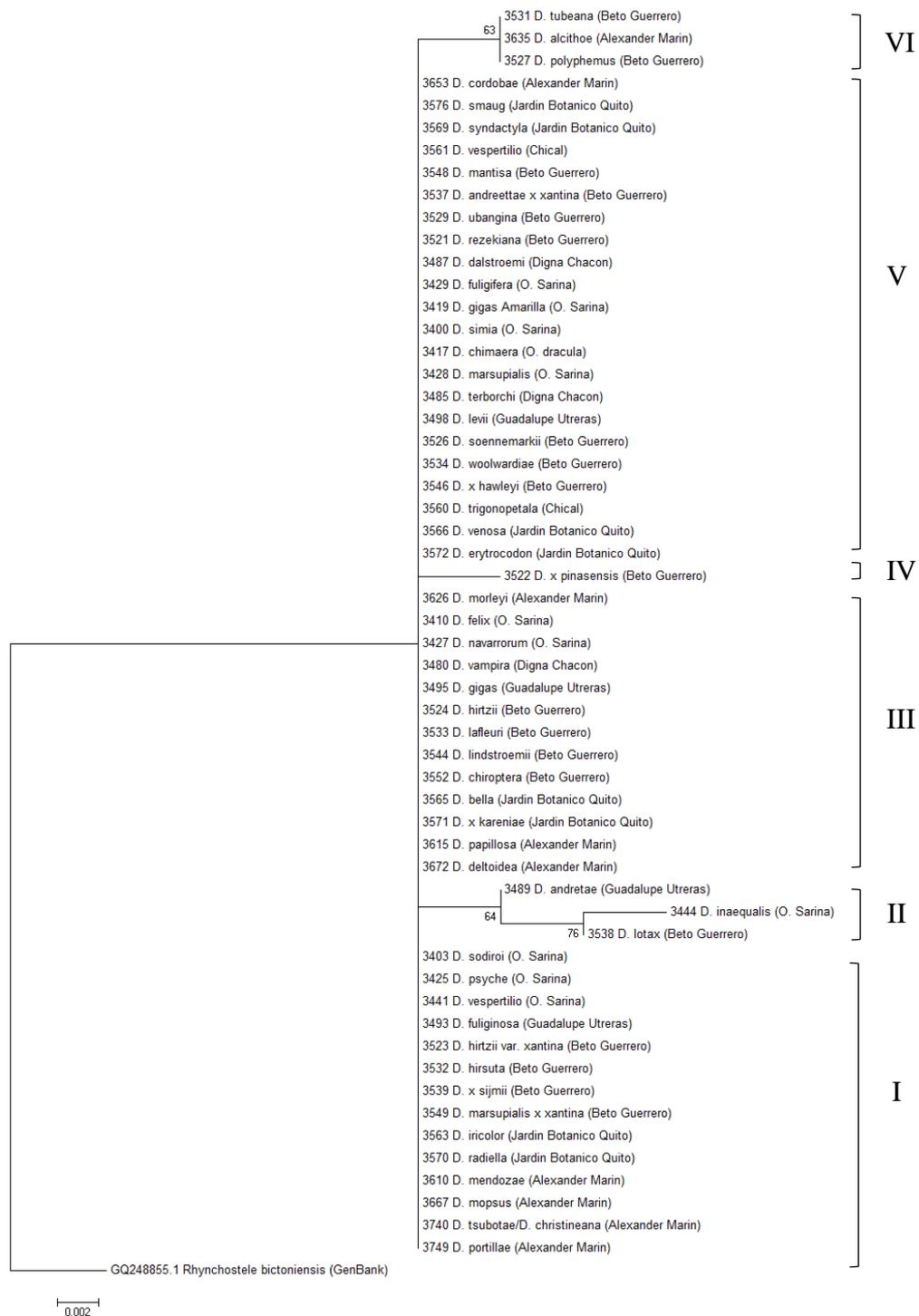


Figura 14. Árbol filogenético Neighbor-Joining de la región *rpoB* mediante el método Jukes-Cantor y bootstrap de 1000 réplicas.

Nota: El análisis involucró 57 secuencias de nucleótidos de las cuales *Rhynchostele bictoniensis* es una secuencia tomada del Genbank. Las especies del género *Dracula* se agrupan en 6 clados sin resolver, lo que demuestra que *rpoB* no es discriminativo para diferenciar la clasificación subgenérica de *Dracula*.

Fuente: Datos procesados con el software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

Árbol filogenético Neighbor-Joining de regiones *matK* y *rpoC1* concatenadas del género *Dracula*

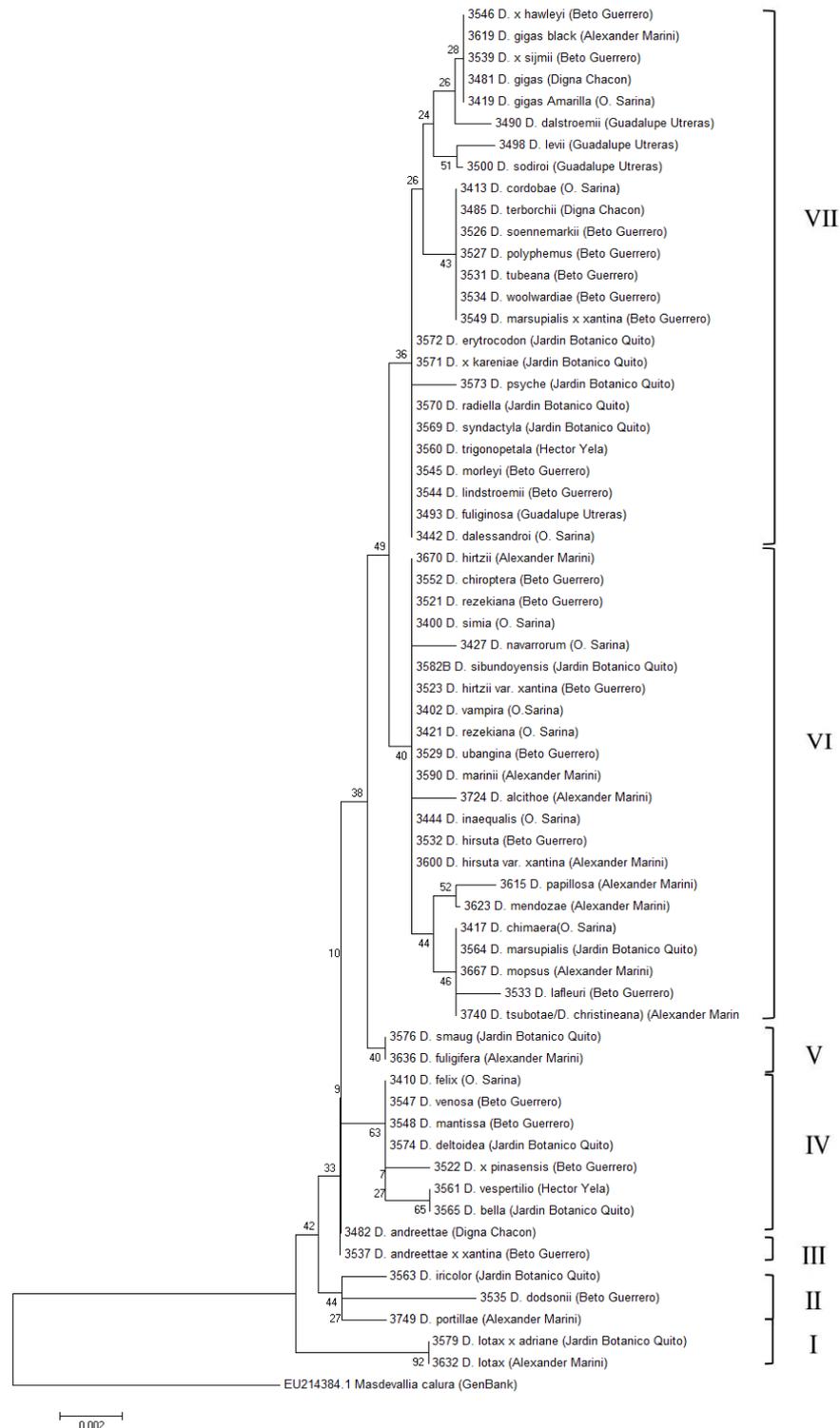


Figura 15. Árbol filogenético Neighbor-Joining concatenadas las regiones *matK* y *rpoC1* mediante el método Jukes-Cantor y bootstrap de 1000 réplicas.

Nota: El análisis involucró 64 especies de las cuales *Masdevallia calura* es una secuencia tomada del GenBank. Al igual que en el árbol filogenético con *matK* las especies del género *Dracula* se agruparon en 7 clados, lo cual demuestra que *matK* y *rpoC1* concatenados no reflejan variación en la conformación de grupos a pesar de presentar pequeñas variaciones en los soportes de ramas; *matK* y *rpoC1* concatenados permiten discriminar especies hasta el nivel subsección.

Fuente: Datos procesados con el software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

El árbol desarrollado con las secuencias de *matK* y *rpoC1* concatenadas para 64 especies del género *Dracula* y una especie *Masdevallia calura* (grupo externo) ver figura 15; fue posible determinar que no existe variación en la conformación de los grupos al comparar el árbol concatenado *matK-rpoC1* con el árbol *matK*, únicamente presentan mínimas variaciones en los soportes de rama. No se pudo elaborar más concatenaciones debido a que no se pudo obtener secuencias de *rpoB* de todas las especies de *Dracula*. Los grupos formados se describen a continuación:

Grupo I: Conformado por *D. lotax* y *D. lotax x adriane*; se agrupan de forma basal diferenciándose del resto de *Draculas*; este resultado difiere de la clasificación subgenérica propuesta por Luer (1993) ubicando a *D. lotax* dentro de la serie *Parviflorae* junto a otras especies como *D. dalessandroi*, *D. marsupialis*, *D. radiella* ect.; por lo que podría no tener sentido ya que *D. lotax* se diferencia en parte por su morfología al resto de las especies integradas en la serie *Parvifloreae*; según Pupulin *et al.* (2009), su flor se asemeja al rostro de “un payaso” por esta razón su nombre proviene del griego *lotax* el cual se derivó en alusión a la cara imaginaria vista en la flor; es endémico de los bosques húmedos del este y sureste de Ecuador en elevaciones entre 900 y 1600 msm.

Grupo II: formado por las especies *D. dodsonii*, *D. iricolor* y *D. portillae*; el grupo es similar a la clasificación subgenérica presentada por Luer (1993), este grupo se encuentra dentro de la sección *Dodsonia*; estas especies presentan características florales y vegetativas distintas al resto de especies en el género por ejemplo: presentan labelo plano con una separación indefinida del hipoquilo y epiquilo;

presentan un hábito de crecimiento leve e inflorescencia erguida, sépalos extendidos, pétalos bivalvados en el ápice y floración sucesiva.

Grupo III: está conformado por *D. andreetae* y la especie híbrida *D. andreetae x xantina*, este grupo es similar a la clasificación propuesta por Luer (1993); este se define como un grupo basal, se clasifica dentro del subgénero *Dracula* sección *Andreetaea*; en este grupo solo existe un representante que es *D. andreetae*; la especie híbrida *D. andreetae x xantina* apareció junta debido a su similitud genética. Según Pupulin *et al.* (2009) *D. andreetae* es diferente de todo el resto de *Draculas* en cuanto su morfología por su labelo único totalmente convexo y con pétalos largos con pedúnculos.

Grupo IV: Se conformaron dos clados: el primero *D. felix*, *D. venosa*, *D. mantisa* y *D. deltoidea* con un soporte de rama de 63; el segundo clado *D. vespertilio* y *D. bella* con un soporte de rama de 65; este grupo es similar a la clasificación propuesta por Luer (1993), en su clasificación subgenérica las agrupa en la subsección *Costatae* y las denomina como especies con ovario crestado; estas especies son morfológicamente similares y debido a sus características florales únicas este grupo presenta hojas delgadas, flores pequeñas pegadas a la hoja o hacia abajo; el primer clado comparado con el segundo clado se diferencia en el tamaño de la flor; la característica que le diferencia a la subsección *Costatae* de los otros grupos es que forman una sola flor por inflorescencia excepto por *D. mantisa* que florece más de una flor. Se esperaba que *D. mopsus* y *D. Inaecualis* se incluyeran dentro de este grupo por presentar de igual forma ovarios con cresta, pero se incluyeron dentro del

grupo VI por lo cual se presume que se debió a una mala identificación morfológica en la recolección de las muestras.

Grupo V: formado por *D. smaug* y *D. fuligifera* se agruparon en un taxón que ocupa una posición aislada y que no representa una afinidad clara con otras especies, este grupo difiere de la conformación propuesta por Luer (1993), presumiblemente se debe a su soporte de rama de 40 que es bajo; según Baquero *et al.* (2014) *D. smaug* es una especie de flores naranjas, redondas y profundamente connadas, labelo blanco más grande sin líneas o manchas, el epiquilo más ancho con tres lamelas de tamaño similar y el borde subdenticulado, y de sépalos pubescentes; *D. fuligifera* Luer (1993), menciona que su nombre se derivó del latín *fuligifer*, que significa tiznado con hollín, una sustancia grasa y negra que deposita el humo en la superficie de los cuerpos, en referencia al color oscuro de sus flores.

Grupo VI: Presenta un soporte de rama de 40, que a su vez agrupa a 6 clados los cuales no tienen concordancia con lo propuesto por (Luer, 1993). En este grupo existe mucha hibridación de especies de la cordillera oriental con los de la cordillera occidental; presentan hojas largas, inflorescencias rectas horizontales, una sola flor por inflorescencia aunque pueden existir excepciones.

D. rezequi es interesante que se haya agrupado en el grupo VI ya que es la única *Dracula* de hojas anchas que se encuentra en la Amazonía, además de ser la única en este grupo en el que el labelo se presenta unido es decir no hay diferencia entre el hipoquilo y epiquilo; lo que hace asumir que es un híbrido natural creado desde hace mucho tiempo atrás.

VII: Último grupo conformado con un soporte de rama de 36, que incluye a 4 clados que se asemejan a la clasificación propuesta por (Luer, 1993) en el subgénero *Dracula* section *Dracula* subsection *Dracula*.

El árbol filogenético Neighbor-Joining de regiones *matK-rpoC1* concatenadas no separa las especies de los andes orientales con las especies de los andes occidentales por ejemplo: *D. vampira*, *D. chiroptera*, *D. chimaera*, *D. hirtzii* y *D. ubangina* que son de flores grandes del occidente no formó un clado distinto de *D. simia*, *D. hirsuta*, *D. marinii* y *D. sibundoyensis* que son especies de los andes orientales.

D. psyche es morfológicamente distinto e inconfundible al resto de especies en las que se encuentra agrupado, según Luer (1993) su morfología tiene semejanza a la de *Masdevallia* pero con un labelo más diferenciado, se presume que es por esta razón que *D. psyche* se encuentra distante en el clado.

Claramente se evidenció que el clado conformado por *D. cordobae*, *D. polyphemus*, *D. terborchii*, *D. tubeana* y *D. woolwardiae* es semejante a lo propuesto por Luer, (1993) estas especies se clasifican dentro de la Serie *Dracula*, pero Luer no incluye a *D. marsupialis* a pesar de tener sentido de que esta especie se ubique dentro de este clado por presumir que es un híbrido entre *D. cordobae* y *D. woolwardiae*; el mismo caso presentó *D. soennemarkii* que también tiene sentido de que se ubique dentro de este clado por lo que sospecha que es un híbrido natural entre *D. cordobae* y *D. iricolor*.

El clado conformado por *D. x hawleyi*, *D. gigas*, *D x sijmii*, *D. dalstroemii*, *D. levii* y *D. sodiroi* no se asemeja a ninguna conformación propuesta por Luer (1993), Estas especies si comparten características morfológicas por lo que no es concordante con Luer.

El subgénero *Soidora* propuesto por Luer (1993) que incluye dos especies no se evidencia que está bien clasificado, es absolutamente artificial ya que *D. sodiroi* y *D. erythrocodon* según el Árbol filogenético Neighbor-Joining de regiones *matK* y *rpoC1* concatenadas se encuentran dentro del grupo VII lo que las hace pariente de *D. gigas*; estos resultados se asemejan a lo descrito por Pridgeon, Solano, y Chase (2001) y mencionan que el subgénero *Sodiroa* está incrustado en especies del subgénero *Dracula*; morfológicamente se parecen en las plantas y en la forma de florecer, con inflorescencia hacia arriba largas por afuera de la bráctea y hojas delgada.

En este estudio existió un bajo nivel de divergencia molecular entre las especies, pero aun así se propone realizar cambios en la clasificación subgenérica realizada por Luer (1993), la nueva clasificación subgenérica debería ser similar a la obtenida en este estudio molecular.

3.3 Georreferenciación

La búsqueda en la base de datos en Tropicos (2017) permitió recabar información para el análisis de zonas de diversificación del género *Dracula*, ver anexo 3.

El género *Dracula* está particularmente diversificado en la cordillera central y en los Andes occidentales desde el sureste de México hasta Perú como lo mencionan Calderón y Farfán (2003), esto es corroborado en el mapa de distribución geográfica de la Figura 16 .

Distribución geográfica del género *Dracula*

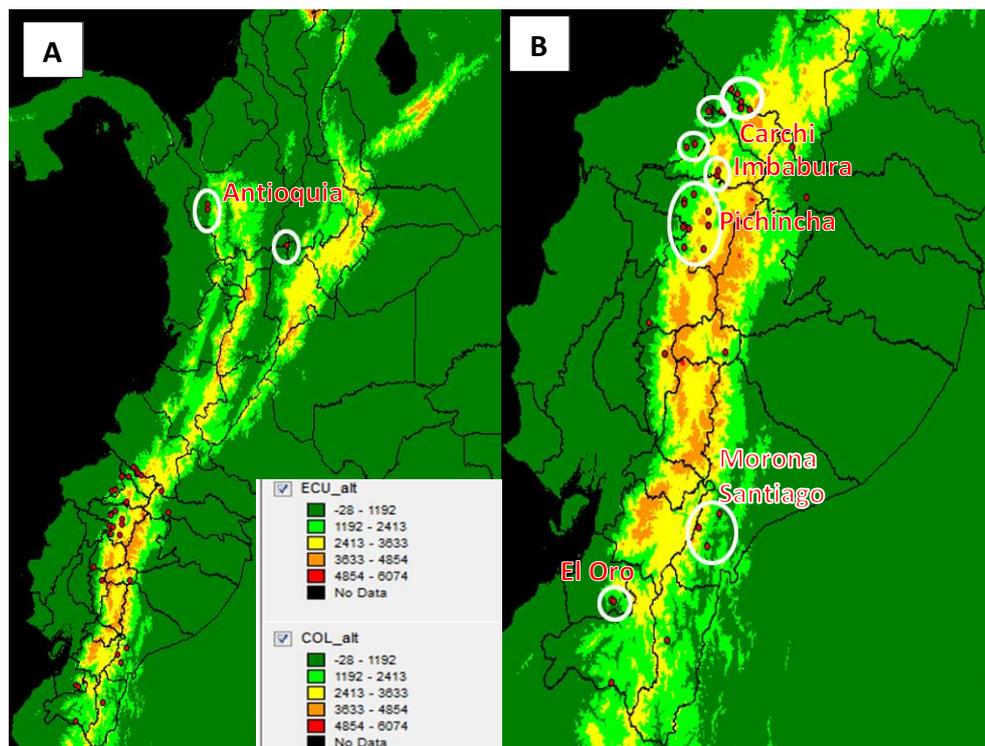


Figura 16. Zonas de diversificación del género *Dracula*.

Nota: Imagen “A” representa la distribución de especies del género *Dracula* a nivel del mundo.

Imagen “B” representa la distribución de especies del género *Dracula* a nivel de Ecuador; las especies se representan con puntos rojos y las zonas de diversificación se representan con círculos blancos.

Fuente: Información obtenida del programa DIVA-GIS v.7 (Hijmans *et al.*, 2004).

En los andes, las zonas de diversificación de *Dracula* fueron en: Carchi, Imbabura, Pichincha, y Bolívar; dentro de las provincias amazónicas, *Dracula* se encontró con mayor densidad en Morona Santiago a diferencia de Sucumbíos y Zamora Chinchipe.

Se observó que la zona más diversa del mundo es la provincia Carchi con alrededor de 13 especies como son: *D. gigas*, *D. levii*, *D. erythrocodon*, *D. psyche*, *D. andreettae*, *D. fuliginosa*, *D. iricolor*, *D. radiella*, *D. chiroptera*, *D. terborchii*, *D. trigonopetala*, *D. lindstroemii* y *D. vespertilio* en una altura entre 1192 – 2413 msn.

Las especies integradas en esta zona de diversificación con excepción de *D. andreettae*, *D. iricolor* y *D. terborchii* se asemejan a la agrupación VII conformada

en el árbol filogenético Neighbor-Joining de regiones *matK* y *rpoCl* concatenadas del género *Dracula*; por lo que se podría deducir que existe una relación entre la distribución geográfica con la conformación filogenética (Hernandez-Pellicer, 2003).

En el sur del país tenemos *D. simia*, *D. dalessandroi*, *D. mendozae* y *D. deltoidea*.

La provincia de Imbabura también formó una zona de diversificación con *D. chiroptera*, *D. morley*, *D. felix* y *D. lafleuri*.

Antioquia es el departamento del noroeste de Colombia donde se evidenció otra zona de diversificación de *Dracula* con *D. chimaera*, *D. platycrater* y *D. wallisii*.

Las especies agrupadas dentro de Antioquia, Imbabura y del sur del país no presentan similitud con el árbol filogenético Neighbor-Joining de regiones *matK* y *rpoCl* concatenadas.

Existieron registros de especies de *Dracula* que lograron cruzar la barrera de la cordillera de los andes como fue el ejemplo de *D. vespertilio* que logró llegar hasta la Amazonía.

4. Conclusiones

El muestreo realizado en 7 lugares diferentes logró abarcar todas las 56 especies descritas en el Ecuador con repeticiones de hasta 3 individuos por especie.

El protocolo de extracción química Doyle y Doyle resultó exitoso para extraer ADN de muestras de orquídeas específicamente del género *Dracula*.

Las condiciones establecidas en el termociclador permitieron amplificar las tres regiones *matK*, *rpoCl* y *rpoB* obteniendo buenos productos de ADN para la secuenciación.

Los marcadores moleculares que presentaron el menor potencial de discriminación son los marcadores *rpoCl* y *rpoB* siendo el mejor marcador *matK* por presentar mayor variabilidad interespecie según lo establecido en los árboles filogenéticos.

Aunque el análisis de los marcadores *matK* y *rpoCl* concatenados pudo establecer las mejores relaciones filogenéticas dentro del género *Dracula*, se pudo determinar que se requiere de más marcadores informativos y de un muestreo completo de especies pertenecientes a todo el género y no solo de Ecuador.

La clasificación subgenérica del género *Dracula* conocida hasta el momento se evidencia que existe una considerable confusión, según los resultados obtenidos de los datos BARCODE que facilitaron la identificación de problemas taxonómicos.

5. Recomendaciones

Realizar una correcta identificación morfológica para la colección de muestras.

Realizar el transporte de muestras colectadas en frío para evitar la oxidación y la degradación del material genético. Investigar con nuevas regiones de ADN cloroplástico y nuclear que permitan resolver las inconsistencias subgenéricas del género *Dracula*.

Continuar con los estudios moleculares con un mayor número de especies del género *Dracula*, con el fin de corroborar la eficiencia de los códigos de barra de ADN en la identificación de este género.

6. Bibliografía

- Aguilar, S. (2003). *Utilización de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas*. Honduras: Zamorano.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso De Marcadores Moleculares En Plantas ; Aplicaciones En Frutales Del Trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–241. <https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>
- Baquero, L., Meyer, G., Vieira, S., & Larsen, B. (2014). *Orquideología*. (G. Aguirre, Ed.). Medellín: Sociedad Colombiana de Orquideología.
- Baquero Rivadeneira, L., & Moncayo Cárdenas, N. (2017). *ECUADOR – South America Orchidaceae: Epidendreae: Subtribe: Pleurothallinidae: Genus Dracula* (1). Retrieved from <http://fieldguides.fieldmuseum.org/guides/guide/891>
- Barthet, M. M., Moukarzel, K., Smith, K. N., Patel, J., & Hilu, K. W. (2015). Alternative translation initiation codons for the plastid maturase MatK: unraveling the pseudogene misconception in the Orchidaceae. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0491-1>
- BOLDSYSTEMS. (2017). Identification Request | BOLDSYSTEMS. Retrieved December 10, 2017, from http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine
- Bremer, B., Bremer, K., Chase, W., Fay, F., Reveal, L., Bailey, H., ... Stevens, F. (2009). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121. <https://doi.org/10.1111/j.1095->

8339.2009.00996.x

Calderón, E., & Farfán, J. (2003). Especies de los géneros *Dracula* y *Masdevallia* (Orchidaceae) en Colombia. *Biota Colombiana*, 4(2), 187–201.

Carrión, M. (2009). *Identificación de Orquídeas Epífitas del Ecuador mediante DNA Barcoding*. Universidad Particular de Loja, Loja.

CBOL Plant Working Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12794–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>

Cetzal-Ix, W., Carnevali, G., & Romero-González, G. (2016). Synopsis of the *Trichocentrum*-Clade (Orchidaceae, Oncidiinae). *Harvard Papers in Botany*, 21(2), 141–169. <https://doi.org/10.3100/hpib.v21iss2.2016.n3>

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE*, 5(1), e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>

Cruz, M. (2011). *Análisis filogenético de los subgéneros Persea Y Eriodaphne (Persea; Lauraceae) mediante secuencias de ADN nuclear, mitocondrial y cloroplasto*. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo.

Cuéllar, M. (2011). *Código de barras genético de algunas orquídeas veracruzanas bajo riesgo de extinción*. Universidad Veracruzana, Xalapa.

Di Pardo, A., Chiocchio, V., Barrera, V., Colombo, R. P., Martinez, A. E., Gasoni, L., & Godeas, A. M. (2015). Mycorrhizal fungi isolated from native terrestrial orchids of pristine regions in Córdoba (Argentina). *Revista de Biología*

Tropical, 63(1), 275–283. Retrieved from
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442015000100022&lng=en&nrm=iso&tlng=en

Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S. (2012). Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLoS ONE*, 7(4), e35071.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035071>

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.

Geospiza. (2012). FinchTV | Digital World Biology. Retrieved December 18, 2017, from <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>

Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., ... Cameron, K. M. (2016). Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *Journal of Biogeography*, 43(10), 1905–1916. <https://doi.org/10.1111/jbi.12854>

Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., & Robert, H. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 10, 21. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>

Herber, P. (2014). *Inventario taxonómico de especies de la familia orchidaceae en un área de bosque andino del predio la sierra, santuario de fauna y flora guanentá alto rio fonce*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Duitama. Retrieved from
<http://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/2539/3/7>

Hernandez-Pellicer, C. C. (2003). *Relacion entre distribucion y posicion filogenetica en las especies del genero Tropaeolum, seccion Chilensia*. Universidad de Chile.

Hijmans, R. J., Rojas, E., Cruz, M., O'Brien, R., Barrantes, I., Jarvis, A., & Guarino, L. (2004). DIVA-GIS | free, simple & effective. Retrieved December 18, 2017, from <http://www.diva-gis.org/>

Hoyos, L., & Rodríguez, A. (2013). *Aislamiento de micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

Klaus, W. (2015). Riqueza de la familia Orchidaceae en la zona de visitantes del Parque Nacional Cerro Azul Meámbar de Honduras. *Lankesteriana*, 15(3), 203–210. <https://doi.org/10.15517/lank.v15i3.21667>

Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., ... Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2923–2928. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709936105>

Lee, S. Y., Ng, W. L., Mahat, M. N., Nazre, M., & Mohamed, R. (2016). DNA Barcoding of the Endangered Aquilaria (Thymelaeaceae) and Its Application in Species Authentication of Agarwood Products Traded in the Market. *PloS One*, 11(4), e0154631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154631>

- León, E., & Molina, R. (2015). *Aislamiento y selección de micorrizas con evaluación preliminar de su efecto en la germinación de orquídeas en el orquideario de la Universidad de Cuenca*. Universidad Estatal de Cuenca, Cuenca. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/23090/1/Tesis.pdf>
- Luer, C. A. (1993). Icones Pleurothallidarum X. Systematics of *Dracula*. *Monographs in Systematic Botanic from Missouri Botanical Garden*, 46, 1–244.
- Luo, J., Hou, B.-W., Niu, Z.-T., Liu, W., Xue, Q.-Y., & Ding, X.-Y. (2014). Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications. *PloS One*, 9(6), e99016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099016>
- Macrogen. (2017). Macrogen Online Sequencing Order System Macrogen Online Sequencing Order System. Retrieved December 10, 2017, from https://dna.macrogen.com/esp/support/ces/guide/order_guide.jsp
- Massensini Jr., A. (2013). Filogenia molecular de *Acianthera* Scheidw. (Orchidaceae) com ênfase nas espécies rupícolas do gênero e variabilidade genética do complexo *Acianthera prolifera* Lindl., 1–111.
- Meyer, G., & Cameron, K. M. (2009). A preliminary phylogenetic study of *Dracula* (Pleurothallidinae, Epidendroideae, Orchidaceae) based on plastid matK sequence data. *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*, 100–114.
- Ministerio de Turismo del Ecuador. (2014). *Dracula Gigas* es la orquídea emblemática de Carchi. Retrieved September 1, 2017, from <http://www.turismo.gob.ec/dracula-gigas-es-la-orquidea-emblematica-de-carchi/>

- Molineros, F. (2012). *Caracterización morfológica y filogenia del género vanilla en el distrito de Buenaventura-Valle del Cauca (Colombia)*. Palmira: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA. Retrieved from <http://www.unal.edu.co/>
- Niu, Z., Xue, Q., Zhu, S., Sun, J., Liu, W., & Ding, X. (2017). The Complete Plastome Sequences of Four Orchid Species: Insights into the Evolution of the Orchidaceae and the Utility of Plastomic Mutational Hotspots. *Frontiers in Plant Science*, 8, 715. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00715>
- Pérez-Almeida, I., Angulo, L., Osorio, G., Ramis, C., Bedoya, Á. M., Figueroa-Ruiz, R., ... Infante, D. (2011). Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro*, 23(1), 27–34.
- Policha, T. (2014). *Pollination biology of the mushroom-mimicking orchid genus Dracula*. Eugene: University of Oregon.
- Policha, T., Davis, A., Barnadas, M., Dentinger, B. T. M., Raguso, R. A., & Roy, B. A. (2016). Disentangling visual and olfactory signals in mushroom-mimicking *Dracula* orchids using realistic three-dimensional printed flowers. *New Phytologist*, 210(3), 1058–1071. <https://doi.org/10.1111/nph.13855>
- Pridgeon, A. M., Solano, R., & Chase, M. W. (2001). Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*, 88(12), 2286–308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669661>
- Pupulin, F., Merino, G., & Medina, H. (2009). *Draculas del Ecuador*. (J. Páez, Ed.). Quito: Universidad Alfredo Pérez Guerrero. Retrieved from

[http://www.epidendra.org/LITERATURE/Pupulin et al. 2009 - Dracula book/Pupulin 2009 & al. - DRACULAS OF ECUADOR light.pdf](http://www.epidendra.org/LITERATURE/Pupulin%20et%20al.%202009%20-%20Dracula%20book/Pupulin%202009%20&%20al.%20-%20DRACULAS%20OF%20ECUADOR%20light.pdf)

Raya, Y. (2013). *CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE Laelia halbingeriana Y SU PROPAGACIÓN in vitro*. Montecillo: COLEGIO DE POSTGRADUADOS INSTITUCION.

Rivas, P., & Salazar, P. (2017). *Comparación de la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico y una nuclear en el ishpingo (O. quixos) provenientes de 5 provincias de la amazonía ecuatoriana*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/14196>

Saarela, J. M., Sokoloff, P. C., Gillespie, L. J., Consaul, L. L., Bull, R. D., & Labra, M. (2013). DNA Barcoding the Canadian Arctic Flora: Core Plastid Barcodes (rbcL + matK) for 490 Vascular Plant Species. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077982>

Salazar, G. A., Chase, M. W., Soto Arenas, M. A., & Ingrouille, M. (2003). Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany*, 90(5), 777–795. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.5.777>

Sánchez, D. (2016). *Los códigos de barra de ADN como herramienta en la identificación de las especies Micropholis (Griseb.) Pierre (SAPOTACEAE)*. UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS, Bogotá.

Sinchire, R. (2010). *Identificación de hongos parásitos en 14 especies del género Dracula sembradas bajo invernadero*. Loja: Universidad Particular de Loja. Retrieved from <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1767/3/Sinchire>

- Singer, R. B. (2009). Floral Morphology and Pollination in Orchidaceae: Charles Darwin's Second Book. *Acta Biol. Colomb*, 14, 337–350. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/3190/319028030009.pdf>
- Singh, H. K., Parveen, I., Raghuvanshi, S., & Babbar, S. B. (2012). The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. *BMC Research Notes*, 5, 42. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-42>
- Siripiyasing, P., Kaenratana, K., Mokkalul, P., Tanee, T., Sudmoon, R., & Chaveerach, A. (2012). DNA barcoding of the *Cymbidium* species (Orchidaceae) in Thailand. *Frican Journal of Agricultural Research*, 7(3), 393–404. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.1434>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- The Plant List. (2017). The Plant List. Retrieved July 18, 2017, from <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/>
- Thermo Fisher Scientific. (2017a). DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) - Thermo Fisher Scientific. Retrieved December 2, 2017, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1081>
- Thermo Fisher Scientific. (2017b). Phire Plant Direct PCR Master Mix - Thermo Fisher Scientific. Retrieved December 2, 2017, from

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F160S>

Tropicos. (2017). Tropicos.org. Retrieved December 19, 2017, from <http://www.tropicos.org>

Vindas-Rodríguez, M., Rojas-Jiménez, K., & Tamayo-Castillo, G. (2011). Evaluation of three chloroplastic markers for for barcoding and for phylogenetic reconstruction purposes in native plants of Costa Rica. *Ciencia Y Tecnología*, 27, 24–34. Retrieved from <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/cienciaytecnologia/article/view/3767>

von Cräutlein, M., Korpelainen, H., Pietiläinen, M., & Rikkinen, J. (2011). DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and Conservation*, 20(2), 373–389. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9964-0>

Wilson, M., Frank, G. S., Jost, L., Pridgeon, A. M., Vieira-Uribe, S., & Karremans, A. P. (2017). Phylogenetic analysis of Andinia (Pleurothallidinae; Orchidaceae) and a systematic re-circumscription of the genus. *Phytotaxa*, 295(2), 101–131. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.295.2.1>

Zambrano, B. J., & Solano-Gómez, R. (2011). Un nuevo híbrido natural de *Dracula* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) del suroccidente de Ecuador. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(3), 758–761.

7. Anexos

Anexo 1. Condiciones de temperatura en el termociclador.

| Etapas | Temperatura en °C | Tiempo | Ciclos |
|--------------------------------------|------------------------------|---------------|---------------|
| Desnaturalización inicial | 94 | 1 min | 1 |
| Desnaturalización | 94 | 30 s | 30 |
| Hibridación | 53 | 40 s | |
| Elongación | 72 | 40 s | |
| Elongación final | 72 | 5 min | 1 |

Nota: Protocolo de amplificación con temperatura y tiempo para PCR convencional
Fuente: Autor.

Anexo 2. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN

| NÚMERO DE MUESTRA | CÓDIGO DE COLECCIÓN | NOMBRE CIENTÍFICO | EXTRACCIÓN DE ADN | AMPLIFICACIÓN | | | SECUENCIACIÓN | | |
|-------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------|---------------|--------------|-------------|---------------|--------------|-------------|
| | | | | <i>matK</i> | <i>rpoC1</i> | <i>rpoB</i> | <i>matK</i> | <i>rpoC1</i> | <i>rpoB</i> |
| 1 | 3635 | <i>Dracula alcithoe</i> | + | + | + | + | - | - | + |
| 2 | 3724 | <i>Dracula alcithoe</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 3 | 3482 | <i>Dracula andreettae</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 4 | 3489 | <i>Dracula andreettae</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 | 3559 | <i>Dracula andreettae</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 6 | 3537 | <i>Dracula andreettae x xantiana</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 7 | 3565 | <i>Dracula bella</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 8 | 3608 | <i>Dracula bella</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 9 | 3411 | <i>Dracula chimaera</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 10 | 3483 | <i>Dracula chimaera</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 11 | 3567 | <i>Dracula chimaera</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 12 | 3417 | <i>Dracula chimaera</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 13 | 3552 | <i>Dracula chiroptera</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 14 | 3413 | <i>Dracula cordobae</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 15 | 3653 | <i>Dracula cordobae</i> | + | + | + | + | - | - | + |
| 16 | 3442 | <i>Dracula dalessandroi</i> | + | + | + | + | + | - | - |
| 17 | 3487 | <i>Dracula dalstroemii</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 18 | 3490 | <i>Dracula dalstroemii</i> | + | + | + | + | + | - | - |
| 19 | 3693 | <i>Dracula dalstroemii</i> | + | + | - | - | - | - | - |
| 20 | 3574 | <i>Dracula deltoidea</i> | + | + | + | - | + | + | - |
| 21 | 3672 | <i>Dracula deltoidea</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 22 | 3535 | <i>Dracula dodsonii</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 23 | 3586 | <i>Dracula dodsonii</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 24 | 3638 | <i>Dracula dodsonii</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 25 | 3412 | <i>Dracula erytrocodon</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 26 | 3572 | <i>Dracula erytrocodon</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 27 | 3410 | <i>Dracula felix</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 28 | 3708 | <i>Dracula felix</i> | + | + | - | - | - | - | - |
| 29 | 3429 | <i>Dracula fuligifera</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 30 | 3636 | <i>Dracula fuligifera</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 31 | 3493 | <i>Dracula fuliginosa</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 32 | 3481 | <i>Dracula gigas</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 33 | 3494 | <i>Dracula gigas</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 34 | 3495 | <i>Dracula gigas</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 35 | 3419 | <i>Dracula gigas (amarilla)</i> | + | + | + | + | + | + | + |

| | | | | | | | | | |
|----|------|--|---|---|---|---|---|---|---|
| 36 | 3619 | <i>Dracula gigas</i> (black) | + | + | - | - | + | - | - |
| 37 | 3408 | <i>Dracula gigas</i> (Rosada) | + | + | + | + | - | - | - |
| 38 | 3612 | <i>Dracula gigas</i> (amarilla) | + | + | - | - | - | - | - |
| 39 | 3532 | <i>Dracula hirsuta</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 40 | 3578 | <i>Dracula hirsuta</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 41 | 3624 | <i>Dracula hirsuta</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 42 | 3600 | <i>Dracula hirsuta</i> var. <i>Xantina</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 43 | 3524 | <i>Dracula hirtzii</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 44 | 3583 | <i>Dracula hirtzii</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 45 | 3670 | <i>Dracula hirtzii</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 46 | 3523 | <i>Dracula hirtzii</i> var. <i>Xantina</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 47 | 3444 | <i>Dracula inaequalis</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 48 | 3426 | <i>Dracula iricolor</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 49 | 3488 | <i>Dracula iricolor</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 50 | 3563 | <i>Dracula iricolor</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 51 | 3533 | <i>Dracula lafleurii</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 52 | 3669 | <i>Dracula lafleurii</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 53 | 3498 | <i>Dracula levii</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 54 | 3544 | <i>Dracula</i> <i>lindstroemii</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 55 | 3538 | <i>Dracula lotax</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 56 | 3632 | <i>Dracula lotax</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 57 | 3579 | <i>Dracula lotax</i> x <i>adriane</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 58 | 3548 | <i>Dracula mantissa</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 59 | 3675 | <i>Dracula mantissa</i> | + | + | - | + | - | - | + |
| 60 | 3520 | <i>Dracula marinii</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 61 | 3585 | <i>Dracula marinii</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 62 | 3590 | <i>Dracula marinii</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 63 | 3428 | <i>Dracula</i> <i>marsupialis</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 64 | 3484 | <i>Dracula</i> <i>marsupialis</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 65 | 3555 | <i>Dracula</i> <i>marsupialis</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 66 | 3564 | <i>Dracula</i> <i>marsupialis</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 67 | 3551 | <i>Dracula</i> <i>marsupialis</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 68 | 3549 | <i>Dracula</i> <i>marsupialis</i> x <i>xantina</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 69 | 3610 | <i>Dracula mendozae</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 70 | 3623 | <i>Dracula mendozae</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 71 | 3667 | <i>Dracula mopsus</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 72 | 3545 | <i>Dracula morleyi</i> | + | + | + | - | + | + | - |

| | | | | | | | | | |
|-----|-------|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 73 | 3626 | <i>Dracula morleyi</i> | + | - | - | + | - | - | + |
| 74 | 3427 | <i>Dracula navarrorum</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 75 | 3409 | <i>Dracula navarrorum</i> | + | + | - | + | - | - | + |
| 76 | 3615 | <i>Dracula papillosa</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 77 | 3617 | <i>Dracula papillosa</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 78 | 3527 | <i>Dracula polyphemus</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 79 | 3749 | <i>Dracula portillae</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 80 | 3573 | <i>Dracula psyche</i> | + | + | + | - | + | + | - |
| 81 | 3425 | <i>Dracula psyche</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 82 | 3405 | <i>Dracula psyche</i> | + | + | - | + | + | - | - |
| 83 | 3625 | <i>Dracula psyche</i> | + | + | - | - | - | - | - |
| 84 | 3404 | <i>Dracula radiella</i> | + | + | + | + | - | + | - |
| 85 | 3570 | <i>Dracula radiella</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 86 | 3421 | <i>Dracula rezekiana</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 87 | 3521 | <i>Dracula rezekiana</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 88 | 3613 | <i>Dracula rezekiana</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 89 | 3536 | <i>Dracula sibundoyensis</i> | + | + | + | - | + | + | - |
| 90 | 3582B | <i>Dracula sibundoyensis</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 91 | 3717 | <i>Dracula sibundoyensis</i> | + | + | - | - | - | - | - |
| 92 | 3400 | <i>Dracula simia</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 93 | 3401 | <i>Dracula simia</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 94 | 3542 | <i>Dracula simia/ D. alcithoe</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 95 | 3576 | <i>Dracula smaug</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 96 | 3403 | <i>Dracula sodiroi</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 97 | 3500 | <i>Dracula sodiroi</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 98 | 3584 | <i>Dracula sodiroi</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 99 | 3526 | <i>Dracula soennemarkii</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 100 | 3424 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 101 | 3414 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 102 | 3554 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 103 | 3557 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 104 | 3558 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 105 | 3562 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 106 | 3530 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 107 | 3541 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 108 | 3553 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 109 | 663 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 110 | 3491 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | - | - | + |
| 111 | 3492 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | - | - | + |
| 112 | 3496 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | - | - | + |
| 113 | 3499 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | - | - | - |

| | | | | | | | | | |
|-----|------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 114 | 3486 | <i>Dracula sp.</i> | + | + | + | + | - | - | + |
| 115 | 3569 | <i>Dracula syndactyla</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 116 | 3485 | <i>Dracula terborchii</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 117 | 3525 | <i>Dracula terborchii</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 118 | 3528 | <i>Dracula trigonopetala</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 119 | 3560 | <i>Dracula trigonopetala</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 120 | 3618 | <i>Dracula trigonopetala</i> | + | + | + | - | - | - | - |
| 121 | 3422 | <i>Dracula tsubotae/D. christineana</i> | + | + | + | + | + | + | - |
| 122 | 3740 | <i>Dracula tsubotae/D. christineana</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 123 | 3531 | <i>Dracula tubeana</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 124 | 3695 | <i>Dracula tubeana</i> | + | + | - | - | - | - | - |
| 125 | 3529 | <i>Dracula ubangina</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 126 | 3646 | <i>Dracula ubangina</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 127 | 3402 | <i>Dracula vampira</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 128 | 3480 | <i>Dracula vampira</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 129 | 3547 | <i>Dracula venosa</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 130 | 3566 | <i>Dracula venosa</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 131 | 3577 | <i>Dracula verticulosa xantina</i> | + | + | + | - | + | + | - |
| 132 | 3441 | <i>Dracula vespertilio</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 133 | 3561 | <i>Dracula vespertilio</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 134 | 3703 | <i>Dracula vespertilio</i> | + | + | - | - | - | - | - |
| 135 | 3534 | <i>Dracula woolwardiae</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 136 | 3550 | <i>Dracula x felix</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 137 | 3593 | <i>Dracula x hawleyi</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 138 | 3546 | <i>Dracula x hawleyi</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| 139 | 3540 | <i>Dracula x Kareniae</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 140 | 3571 | <i>Dracula x kareniae</i> | + | + | - | + | + | - | + |
| 141 | 3611 | <i>Dracula x Kareniae</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 142 | 3627 | <i>Dracula x Kareniae</i> | + | + | - | - | + | - | - |
| 143 | 3522 | <i>Dracula x pinasensis</i> | + | + | + | + | + | + | + |
| 144 | 3539 | <i>Dracula x sijmii</i> | + | + | + | + | + | + | + |

Fuente: Autor

Anexo 3. Datos de georreferenciación del género *Dracula*

| Número | NOMBRE CIENTÍFICO | LATITUD | LONGITUD | ELEVACIÓN | COLECCIONISTA | AÑO | PAÍS - PROVINCIA |
|--------|-----------------------------|---------|----------|---------------|---|------|--------------------------------------|
| 1 | <i>Dracula alcithoe</i> | 0.25 | -78.4 | 1900 m | Stig Dalström, T. Höijer, Hans-Erik Wanntorp & Read, M. | 1993 | Ecuador - Imbabura |
| 2 | <i>Dracula andreettae</i> | 0.9 | -78.1 | 2275 m | Brad Boyle & Jason C. Bradford | 1993 | Ecuador - Carchi |
| 3 | <i>Dracula andreettae</i> | 1.0333 | -78.2167 | 2000 m | Carl A. Luer & et al. | 1977 | Ecuador - Carchi |
| 4 | <i>Dracula chimaera</i> | 6.6667 | -76.3333 | 2150 m | Gordon McPherson | 1988 | Colombia - Antioquia |
| 5 | <i>Dracula chiroptera</i> | -0.25 | -78.7333 | 1800 m | Carl A. Luer & Benigno Malo | 1977 | Ecuador - Pichincha |
| 6 | <i>Dracula chiroptera</i> | -0.4167 | -78.7833 | 1600 m | Carl A. Luer | 1988 | Ecuador - Pichincha |
| 7 | <i>Dracula Christineana</i> | -2.1667 | -81.8333 | - | Carl A. Luer | 1996 | Ecuador |
| 8 | <i>Dracula cordobae</i> | -3.6661 | -79.65 | 950 m | Carl A. Luer | 1985 | Ecuador - El Oro y Los Ríos - Zamora |
| 9 | <i>Dracula dalessandroi</i> | -4.4333 | -79.65 | 2400 m | Stig Dalström & T. Höijer | 1986 | Ecuador Zamora chinchipe |
| 10 | <i>Dracula dalstroemii</i> | 1.0333 | -78.2167 | 2500 m | Stig Dalström | 1983 | Ecuador - Carchi |
| 11 | <i>Dracula dalstroemii</i> | -2.1667 | -81.8333 | - | Rodrigo Escobar | - | Ecuador |
| 12 | <i>Dracula deltoidea</i> | -4.0333 | -78.9833 | 2800 m | Carl A. Luer | 1977 | Ecuador - Zamora chinchipe |
| 13 | <i>Dracula diana</i> | 5.775 | -74.3417 | - | Carl A. Luer | 1978 | Colombia |
| 14 | <i>Dracula dodsonii</i> | -0.2222 | -78.7786 | 1700 m | Vlastimil Zak | 1986 | Ecuador - Pichincha |
| 15 | <i>Dracula dodsonii</i> | 0.0667 | -78.6667 | 2160 m | Calaway H. Dodson & T.A. Dodson | 1986 | Ecuador - Pichincha |
| 16 | <i>Dracula dodsonii</i> | -0.2314 | -78.8028 | 1800 - 2200 m | Jaime L. Jaramillo & Vlastimil Zak | 1985 | Ecuador - Pichincha |
| 17 | <i>Dracula erythrocodon</i> | 0.8667 | -78.1167 | 2000 - 2500 m | W. Scott Hoover | 1987 | Ecuador - Carchi |
| 18 | <i>Dracula erythrocodon</i> | 0.9 | -78.1 | 2000 m | Stig Dalström & et al. | 1996 | Ecuador - Carchi |
| 19 | <i>Dracula felix</i> | 0.8333 | -78.3331 | 1400 m | Calaway H. Dodson & L.B. Thien | 1961 | Ecuador - Carchi |
| 20 | <i>Dracula felix</i> | -0.25 | -78.7333 | 2000 m | Carl A. Luer | 1978 | Ecuador - Pichincha |
| 21 | <i>Dracula fuliginosa</i> | -1.3911 | -78.2939 | 2000 m | Carl A. Luer | 1979 | Ecuador - Pastaza |

| | | | | | | | |
|----|---------------------------------|---------|----------|---------------|----------------------------------|------|--------------------------------------|
| 22 | <i>Dracula gigas</i> | 0.8667 | -78.1 | 2550 m | Benjamin Ollgaard & H. Balslev | 1976 | Ecuador - Carchi |
| 23 | <i>Dracula gigas</i> | 1.0333 | -78.2167 | 1800 - 2200 m | Carl A. Luer & et al. | 1978 | Ecuador - Carchi |
| 24 | <i>Dracula hirsuta</i> | -3.1667 | -78.5167 | 1600 m | Carl A. Luer & et al. | 1980 | Ecuador - Morona Santiago |
| 25 | <i>Dracula hirtzii</i> | 0.25 | -78.4 | 2100 m | Stig Dalström | 1992 | Ecuador - Imbabura |
| 26 | <i>Dracula hirtzii</i> | -0.4333 | -78.55 | 2000 m | Carl A. Luer & et al. | 1978 | Ecuador - Pichincha |
| 27 | <i>Dracula inaequali</i> | -2.1667 | -81.8333 | 1800 - 2400 m | Carl A. Luer & et al. | 2001 | Ecuador - Imbabura - Morona Santiago |
| 28 | <i>Dracula iricolor</i> | 1.0333 | -78.2167 | 2300 m | Carl A. Luer & et al. | 1978 | Ecuador - Carchi |
| 29 | <i>Dracula iricolor</i> | -0.4167 | -78.7833 | 900 m | Carl A. Luer | 1988 | Ecuador - Pichincha |
| 30 | <i>Dracula lafleuri (negra)</i> | -2.1667 | -81.8333 | 1450 m | Carl A. Luer | 2001 | Ecuador - Imbabura |
| 31 | <i>Dracula levii</i> | 1.0333 | -78.2167 | 2600 m | Carl A. Luer & et al. | 1978 | Ecuador - Carchi |
| 32 | <i>Dracula levii</i> | 0.85 | -78 | 2500 m | Stig Dalström | 1992 | Ecuador - Carchi |
| 33 | <i>Dracula lotax</i> | -2.1667 | -81.8333 | 1200 m | Calaway H. Dodson & Alvin Embree | 1985 | Ecuador - |
| 34 | <i>Dracula lotax</i> | -1.3911 | -78.2939 | 1000 m | Carl A. Luer | 1977 | Ecuador - Pastaza |
| 35 | <i>Dracula mantissa</i> | -0.25 | -78.7333 | 1900 m | Carl A. Luer & et al. | 1979 | Ecuador - Pichincha |
| 36 | <i>Dracula mantissa</i> | 5.775 | -74.3417 | 1850 m | Carl A. Luer | 1991 | Colombia - Munic of Ricaurte |
| 37 | <i>Dracula mopsus</i> | -1.11 | -79.2 | 1200 m | Carl A. Luer & et al. | 1979 | Ecuador - Cotopaxi |
| 38 | <i>Dracula mopsus</i> | -3.6831 | -79.6167 | 1300 m | Carl A. Luer & et al. | 1981 | Ecuador - El Oro y Manabí |
| 39 | <i>Dracula morleyi</i> | -2.1667 | -81.8333 | 1900 m | Alexander Hirtz | 1995 | Ecuador - |
| 40 | <i>Dracula navarrorum</i> | -0.2167 | -78.5 | 200 - 2200 m | Stig Dalström | 1992 | Ecuador - Pichincha |
| 41 | <i>Dracula papillosa</i> | 0.8331 | -78.5 | 300 m | Alexander Hirtz | 1991 | Ecuador - Esmeraldas |
| 42 | <i>Dracula platycrater</i> | 6.55 | -76.3167 | 785 - 880 m | Álvaro Cogollo P. | 1988 | Colombia - Antioquia |
| 43 | <i>Dracula polyphemus</i> | 0.2833 | -78.3833 | 2000 m | Stig Dalström | 1983 | Ecuador - Imbabura |
| 44 | <i>Dracula polyphemus</i> | -0.25 | -78.7333 | 2000 m | Carl A. Luer & et al. | 1978 | Ecuador - Pichincha |
| 45 | <i>Dracula portillae</i> | -3 | -78.6167 | 2000 m | Carl A. Luer & et al. | 1980 | Ecuador - Morona Santiago |

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|---------|----------|---------------|--|------|----------------------------|
| 46 | <i>Dracula psyche</i> | 1.0333 | -78.2167 | 2000 m | Carl A. Luer | 1978 | Ecuador - Carchi |
| 47 | <i>Dracula radiella</i> | 1.0333 | -78.2167 | 2400 m | Carl A. Luer | 1977 | Ecuador - Carchi |
| 48 | <i>Dracula rezekiana</i> | 0.05 | -77.3331 | 850 m | Carl A. Luer & et al. | 1986 | Ecuador - Napo |
| 49 | <i>Dracula rezekiana</i> | -2.8667 | -78.3661 | 1300 m | Alexander Hirtz | 1999 | Ecuador - Morona Santiago |
| 50 | <i>Dracula sibundoyensis</i> | 0.5 | -77.5 | 2200 m | Stig Dalström | 1992 | Ecuador - sucumbíos |
| 51 | <i>Dracula simia</i> | -4.0333 | -78.9833 | 1600 - 2000 m | Carl A. Luer | 1976 | Ecuador - Zamora chinchipe |
| 52 | <i>Dracula sodiroi</i> | 0.0167 | -78.79 | 1940 - 2000 m | Efraín Freire, Carlos E. Cerón & R. Morillo | 1996 | Pichincha Ecuador |
| 53 | <i>Dracula sodiroi</i> | -0.02 | -78.79 | 2000 m | Carl A. Luer & et al. | 1979 | Pichincha Ecuador |
| 54 | <i>Dracula terborchii</i> | 1.0333 | -78.2167 | 1200 m | Tropicos / George Schudel | 1999 | Ecuador - Carchi |
| 55 | <i>Dracula tsubotae</i> | 5.775 | -74.3417 | - | R. Barrow | 2002 | Colombia - Nariño |
| 56 | <i>Dracula tubeana</i> | -0.25 | -78.7333 | 2000 m | Carl A. Luer | 1978 | Ecuador - Pichincha |
| 57 | <i>Dracula ubangina</i> | -0.0833 | -78.5 | 1800 m | Stig Dalström | 1992 | Ecuador - Pichincha |
| 58 | <i>Dracula vampira</i> | -0.25 | -78.7333 | 2000 m | Carl A. Luer | 1977 | Ecuador - Pichincha |
| 59 | <i>Dracula venosa</i> | 0.9167 | -78.1 | 2600 m | Carl A. Luer | 1988 | Ecuador - Carchi |
| 60 | <i>Dracula vesperilio</i> | 1 | -78.15 | 1400 m | Carl A. Luer, Jane Luer, Alexander Hirtz, X. Hirtz & Juan del Hierro | 1991 | Ecuador - Pichincha |
| 61 | <i>Dracula wallisii</i> | 5.775 | -74.3417 | 1300 m | Carl A. Luer | 1988 | Colombia - Antioquia |
| 62 | <i>Dracula woolwardiae</i> | 0.5 | -78.75 | 2100 m | Stig Dalström, T. Höjjer & Hans-Erik Wanntorp | 1993 | Ecuador - Imbabura |
| 63 | <i>Dracula woolwardiae</i> | -1.4 | -79.01 | 1250 m | Carl A. Luer, Jane Luer, Alexander Hirtz, X. Hirtz, Juan del Hierro, M. Navarro & F. Navarro | 1991 | Ecuador - Bolivar |
| 64 | <i>Dracula woolwardiae</i> | 0.5314 | -78.66 | 1200 m | Tropicos / Carl A. Luer & et al. | 1993 | Ecuador - Pichincha |
| 65 | <i>Dracula x hawleyi</i> | 1.0333 | -78.2167 | 2500 m | Carl A. Luer & et al. | 1976 | Ecuador - Carchi |
| 66 | <i>Dracula x sijmii</i> | -2.1667 | -81.8333 | 1800 m | Adriana P. Sijm | 1997 | Ecuador - Carchi |

Fuente: (Tropicos, 2017).

